Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und
Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Antikonvulsive Wirkung von Clonazepam beim Hund: Entwicklung von Toleranz und physischer Abhängigkeit

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rudolf Scherkl
Tierarzt aus Niederhatzkofen

Berlin 1985
Journal Nr. 1217

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0057

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus dem Laboratorium für Pharmakologie und
Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Antikonvulsive Wirkung von Clonazepam beim Hund: Entwicklung von Toleranz und physischer Abhängigkeit

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rudolf Scherkl
Tierarzt aus Niederhatzkofen

Berlin 1985
Journal Nr. 1217

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichsprecher: Prof. Dr. F. Hörchner
Referent: Prof. Dr. H.-H. Frey
Korreferent: Prof. Dr. P. Wolf

Tag der Promotion: 08. Februar 1985

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	3
2.1	Clonazepam	3
2.1.1	Biotransformation von Clonazepam	4
2.1.2	Pharmakokinetik von Clonazepam	4
2.1.3	Pharmakodynamik von Clonazepam	6
2.2	Flumazepil (Ro 15-1788)	10
2.3	Pentetrazol	12
2.4	Toleranz	13
2.5	Abhängigkeit	18
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	22
3.1	Methodik	22
3.1.1	Tiermaterial	22
3.1.2	Verwendete Substanzen	23
3.1.3	Versuche zum Nachweis der Toleranz bei subakuter Behandlung	24
3.1.3.1	Bestimmung der Krampfschwellen	25
3.1.3.2	Behandlung mit Clonazepam und Versuchsbeschreibung	25
3.1.4	Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz	27
3.1.4.1	Versuchsvorbereitungen	27
3.1.4.2	Versuchsdurchführung	28
3.1.4.3	Versuchsauswertung	31
3.1.5	Versuche zum Nachweis einer physischen Abhängigkeit	32
3.1.5.1	Versuchsbeschreibung	33
3.1.5.1.1	Auslösen von Entzugserscheinungen durch Flumazepil	33

Seite

3.1.5.1.2	Entzugserscheinungen nach dem Absetzen der oralen Behandlung	34
3.1.5.2	Versuchsauswertung	34
3.1.6	Analytik	36
3.1.6.1	Gaschromatographische Analyse der Plasmakonzentration von Clonazepam	36
3.1.6.2	Gaschromatographische Analyse der Plasmakonzentration von Pentetrazol	37
3.2	Ergebnisse	39
3.2.1	Subakute Behandlung	39
3.2.2	Ergebnisse der Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz	45
3.2.2.1	Beschreibung der Elektroenzephalogramme	45
3.2.2.1.1	EEG vor der Gabe von Pentetrazol	45
3.2.2.1.2	EEG während der Clonazepam-Injektionen	45
3.2.2.1.3	EEG vor und während der Clonazepam-Injektionen	47
3.2.2.2	Herzfrequenz, Blutdruck und Körpertemperatur während der Versuche	50
3.2.2.3	Darstellung der Ergebnisse	50
3.2.3	Ergebnisse der Versuche zum Nachweis einer physischen Abhängigkeit	57
3.2.3.1	Untersuchungen nach dem Absetzen der subakuten Behandlung bei den Versuchen zum Nachweis einer Toleranz	57
3.2.3.2	Ergebnisse der ZTL-Versuche	61
3.2.3.2.1	Entzugserscheinungen nach Injektion von Flumazepil	61
3.2.3.2.2	Entzugserscheinungen nach dem Absetzen der oralen Behandlung	65
4.	DISKUSSION	71
4.1	Entwicklung von Toleranz	71

Seite

4.2 Entstehen von physischer Abhängigkeit 74

5. ZUSAMMENFASSUNG 82

6. LITERATURÜBERSICHT 86

1. EINLEITUNG

Benzodiazepine haben anxiolytische, sedative, muskelrelaxierende und antikonvulsive Wirksamkeit. Seit der Einführung des ersten Vertreters dieser Art von Arzneimitteln, des Chlordiazepoxids im Jahr 1960, sorgten ihre geringe Toxizität, ihre vergleichsweise geringen Nebenwirkungen und ihre prompte und generelle Wirksamkeit für ihren extensiven Einsatz. Schon 1968 wurde in Deutschland für 38 Millionen DM Diazepam hergestellt, was ca. 500.000 Packungen aller Größen pro Monat entspricht (Peters und Seidel, 1970). Heute sind Benzodiazepine die am häufigsten verschriebenen Arzneimittel im allgemeinen therapeutischen Gebrauch in der Humanmedizin (Tallman, 1980).

Bei länger andauernder Behandlung mit Benzodiazepinen wurde von klinischer Seite in zahlreichen Veröffentlichungen von einem Nachlassen der antikonvulsiven Wirkung dieser Arzneimittel berichtet. Genauere Untersuchungen zur Klärung dieser auftretenden Toleranz wurden aber unterlassen oder waren nur hypothetisch. Bestimmungen der Plasmakonzentration von Benzodiazepinen wurden nur selten durchgeführt, und damit war nicht einmal die Klärung der Natur dieser Toleranz möglich.

Auch experimentell liegen gerade zur Frage der Toleranz gegen die antikonvulsive Wirkung von Benzodiazepinen nur wenige Mitteilungen vor.

Diese Fragen und Unklarheiten gaben Anlaß zu der vorliegenden Studie, deren Ziel es war, die Entwicklung einer Toleranz bei einer längeren Clonazepam-Behandlung mit therapeutischen Dosen am Hund experimentell abzuklären.

Dazu wurden 6 Hunde mehrere Wochen lang oral mit Clonazepam behandelt.

Als bei diesen Tieren am Ende des Versuches die Behandlung beendet wurde, waren Symptome zu beobachten, die als Zeichen einer physischen Abhängigkeit von Clonazepam inter-

pretiert werden konnten.

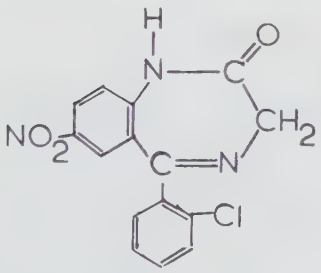
Die Existenz einer milden Form von Abhängigkeit bei Benzodiazepinen ist bekannt und oft beschrieben (Smith, 1977). Nach Meinung vieler Neurologen ist die Gefahr einer Abhängigkeit bei Clonazepam jedoch besonders stark. Viele Patienten würden nach einer Behandlung mit Clonazepam noch danach verlangen, auch wenn der antiepileptische Effekt durch Toleranz verlorengegangen war. Da diese Beobachtungen aber noch nie eindeutig publiziert wurden, wurde die Entwicklung einer physischen Abhängigkeit an einer homogenen, vergleichbaren Gruppe von 6 Hunden unter konstanten Umweltbedingungen in einem zweiten Versuch untersucht.

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

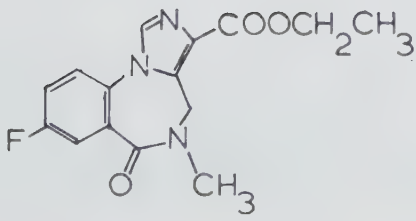
2. LITERATUR

2.1 Clonazepam

Clonazepam ist ein weißes, kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt von 114,4 - 115,6°C. Sein chemischer Name ist 5-(o-Chlorphenyl)1,3-dihydro-7-nitro-2H-1,4benzodiazepin 2on (Steinbach et al., 1963). Das Molekulargewicht beträgt 315,72. Clonazepam ist gut in organischen Lösungsmitteln wie Methanol löslich, jedoch kaum in Wasser. Die pK_a-Werte von Clonazepam liegen bei 1,5 und 10,5.



Clonazepam



Flumazepil

Abb.1:
Strukturformeln
von Clonazepam
und Flumazepil

2.1.1 Biotransformation von Clonazepam

Der Metabolismus von Clonazepam bei Mensch, Hund und Ratte wurde von Eschenhof (1973) untersucht und beschrieben. Er stellte fest, daß Clonazepam durch Reduktion an der NO_2-Gruppe zu dem Hauptmetaboliten 7-Aminoclonazepam abgebaut wird, der dann bei Mensch und Ratte zu 7-Acetaminoclonazepam acetyliert wird. Der Abbauweg beim Hund dagegen ist verschieden, 7-Aminoclonazepam wird bei dieser Spezies nicht acetyliert, sondern zu 3-Hydroxy-7-Aminoclonazepam hydroxyliert. Die Ausscheidung erfolgt in freier und konjugierter Form im Urin (siehe Abb.2).

2.1.2 Pharmakokinetik von Clonazepam

Die Pharmakokinetik von Clonazepam beim Hund wurde von Al-Tahan et al. (1984) beschrieben. Danach folgt die Plasmakonzentration nach intravenöser Injektion teils einem mono-, teils einem biexponentiellen Verlauf. Die Halbwertszeit beträgt 1,4 $\pm$ 0,3 h. In dem Dosisbereich von 0,1 bis 0,5 mg/kg war die Eliminationsgeschwindigkeit dosisabhängig.

Trotz dieser hohen Ausscheidungsgeschwindigkeit bei einmaliger Applikation ließen sich bei zwei- bis dreimaliger täglicher Gabe von 0,5 mg/kg oral Plasmaspiegel aufrechterhalten, wie sie vom Menschen her als therapeutisch bekannt sind. Das läßt sich wahrscheinlich durch eine Sättigung der metabolischen Inaktivierung erklären und macht es möglich, den Hund im Dauerversuch als Modell für den Menschen heranzuziehen.

Bei früheren Versuchen hatten allerdings Knop et al. (1975) und Bekersky et al. (1977) mit 3,7 h und 1,4-2 h etwas höhere Halbwertszeiten angegeben.

Die Geschwindigkeit, mit der Clonazepam die Blut/Hirn-Schranke überwindet, wird unter den Antiepilektika nur noch

von Diazepam übertroffen (Löscher und Frey, 1984). Das liegt an der hohen Lipidlöslichkeit der Substanz und erklärt auch den schnellen Wirkungseintritt von Clonazepam.

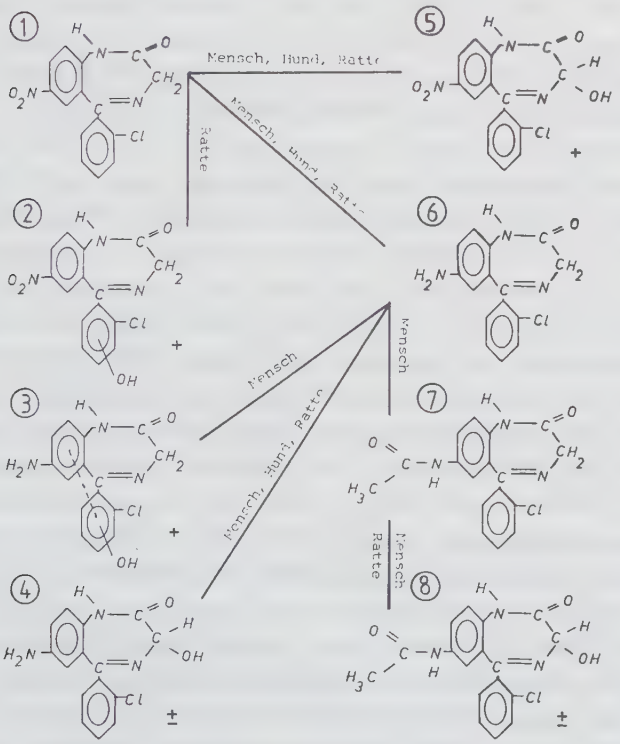


Abb.2: Metabolismus von Clonazepam bei Mensch, Hund und Ratte

1. Clonazepam
2. Phenolischer Metabolit von Clonazepam
3. Phenolischer Metabolit von 7-Amino-clonazepam
4. 3-Hydroxy-7-aminoclonazepam
5. 3-Hydroxyclonazepam
6. 7-Aminoclonazepam
7. 7-Acetaminoclonazepam
8. 3-Hydroxy-7-acetamido-clonazepam

(+) konjugiert (-) frei

2.1.3 Pharmakodynamik von Clonazepam

Clonazepam besitzt im Tierversuch ein sehr breites antikonvulsives Wirkungsspektrum. Schon in kleinsten Dosen (0,15 mg/kg oral) schützt es Mäuse vor generalisierten, durch Pentetrazol induzierten Konvulsionen. Swinyard und Castellion (1966) fanden bei einer Gabe von 0,058 mg/kg i.v. eine Erhöhung der Pentetrazolkrampfschwelle um 100%. Auch gegen andere systemisch applizierte chemische Konvulsiva mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen wie Strychnin, Lokalanästhetika, 2,4-Dimethyl-5-hydroxymethylpyrimidin, Bemegrid und Thiosemicarbazid zeigt Clonazepam einen ausgeprägten Antagonismus (Blum et al., 1973). Bei Kaninchen und Katzen verhindert Clonazepam die enzephalographische und klinische Generalisation ausgehend von experimentell gesetzten Herden, ohne die elektrische Aktivität im Focus selbst wesentlich zu beeinflussen. Es erhöht auch die Schwelle für Elektroschock-Krämpfe bei Mäusen und Katzen (Blum et al., 1973).

Der genaue Wirkungsmechanismus von Clonazepam und den anderen Benzodiazepinen blieb jedoch trotz großer Anstrengungen jahrelang unklar.

Die Auswirkung von Benzodiazepinen auf bekannte und putative Neurotransmitter des Zentralnervensystems wurden gründlich untersucht. Man fand, daß die meisten, z.B. Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin, 5-Hydroxytryptamin und möglicherweise auch Histamin von Benzodiazepinen indirekt beeinflußt werden, indem sie ihre Aufnahme in Neuronen fördern oder hemmen. Nur zwei Transmittersysteme scheinen gänzlich unbeeinflußt zu bleiben, Glutamat und Glycin (Haefely et al., 1982).

Diese allgemeinen Auswirkungen auf verschiedene Transmitter scheinen verständlich, wenn man die Tatsache berücksichtigt, daß auch eine sehr spezifische pharmakologische Interaktion mit einem einzelnen Transmittersystem in dem komplexen neuronalen Zusammenwirken des Zentralnervensystems Kon-

sequenzen auf die Aktivität einer großen Anzahl anderer neuronaler Systeme haben muß. Ein direkter Einfluß der Benzodiazepine auf präsynaptische (Transmittersysteme, -speicherung, -freisetzung und -aufnahme) oder postsynaptische (Rezeptoren oder rezeptorvermittelte Wirkungen, Inaktivierung) Mechanismen dieser Transmittersysteme kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Einflüsse der Benzodiazepine auf diese Transmitter müssen also durch direkte Einwirkungen dieser Arzneimittel auf neuronale Systeme, die oberhalb der cholinergen und aminergen Bahnen liegen, erfolgen. Alle verfügbaren Daten stimmen dahingehend überein, daß die Veränderungen in diesen Systemen sekundär durch Beeinflussung von GABAergen Synapsen (γ-Aminobuttersäure) verursacht werden (Haefely et al., 1981).

Frühere elektrophysiologische Untersuchungen mit Benzodiazepinen hatten gezeigt, daß diese ihre pharmakologischen Wirkungen durch eine Erleichterung der GABA-vermittelten Transmission im ZNS von Säugetieren erzielen (Costa et al., 1975; Haefely et al., 1975). Diese Ergebnisse wurden seitdem durch weitere Experimente bestätigt (Haefely, 1978). GABA ist der wohl wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem und vermittelt seine Wirkung, die Änderung der neuronalen Erregbarkeit, durch das Öffnen von Kanälen für Chlorid-Ionen in der Zellmembran (Martin, 1984). Benzodiazepine erhöhen die Frequenz der Öffnungen bei einer gegebenen Konzentration von GABA (Study und Barker, 1982).

Die betonte Strukturähnlichkeit der verschiedenen Benzodiazepine führte zu der Annahme, die Wirkung dieser Arzneimittel würde durch spezifische pharmakologische Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt. Durch neurochemische Untersuchungen mit ^{3}H-Diazepam mit Hilfe der Radioliganden-Technik ist es dann auch gelungen, hochaffine Bindungsstellen für Benzodiazepine im ZNS von Säugetieren nachzuweisen (Möhler und Okada, 1977; Braestrup und Squires, 1977).

Danach wurde es möglich, das benzodiazepinbindende Protein nach Lösung durch Affinitätschromatographie zu isolieren und zu zeigen, daß die Bindungsstellen für Benzodiazepine und GABA auf der selben physikalischen Struktureinheit lokalisert sind (Sigel, 1983). Man weiß heute, daß die Benzodiazepin-Rezeptoren zusammen mit den GABA-Rezeptoren und dem Protein mit den Chlorid-Kanälen auf einer Art "supramolekularem Komplex" liegen (Olsen, 1982; Möhler und Richards, 1983).

Experimente mit einer Reihe von Agonisten und in den letzten Jahren entdeckten Antagonisten haben zu einem hypothetischen Modell geführt, daß die Interaktionen der verschiedenen Liganden mit dem Benzodiazepin-Rezeptor erklären soll (Polc et al., 1983). In diesem supramolekularen Komplex, der ein Molekulargewicht von etwa 200.000 hat (Chang und Bernard, 1982), könnte der Benzodiazepin-Rezeptor als eine Art Kopplungseinheit zwischen dem GABA-Rezeptor und dem Protein mit den Chloridkanälen fungieren. Eine Stimulierung des GABA-Rezeptors induziert eine Strukturänderung des ganzen Komplexes und löst damit eine Öffnung der Chloridkanäle aus. Benzodiazepine als Agonisten verstärken die Kopplungsfunktion des Benzodiazepin-Rezeptors, indem sie dessen Struktur oder Ladungsverteilung so beeinflussen, daß die Affinität des GABA-Rezeptors gegenüber GABA gesteigert wird.

Der spezifische Benzodiazepin-Antagonist Flumazepil (Ro 15-1788, siehe Abb.1) beeinflußt die GABAerge synaptische Transmission dagegen fast gar nicht, man nimmt also an, daß eine Bindung von Flumazepil an den Benzodiazepin-Rezeptor keine funktionell relevante Strukturänderung zur Folge hat. Flumazepil blockiert so durch kompetitive Interaktion den Zugang anderer Liganden an den Rezeptor (Richards und Möhler, 1984).

ß-Carboline dagegen scheinen bei ihrer Bindung an den Rezeptor eine Strukturänderung zu verursachen, die der von reinen Agonisten bewirkten diametral entgegen wirkt. Sie

haben also eine Depression der Kopplungsfunktion des Benzodiazepin-Rezeptors zur Folge, man kann ß-Carboline als inverse Agonisten bezeichnen. Wo reine Benzodiazepin-Antagonisten eine Steigerung der Frequenz von Chloridkanal-Öffnungen bewirken, müßten diese inversen Agonisten die Frequenz senken.

Einige Fragen bleiben allerdings auch bei dieser Modellvorstellung noch offen. Eine davon ist eine geringe agonistische Wirksamkeit von Flumazepil, die von einigen Autoren beschrieben wird (Jensen et al., 1983; siehe auch unter Abschnitt 2.1.4) und die deswegen auch Flumazepil als schwachen partiellen Agonisten einordnen. File et al. (1982) dagegen beschreiben bei Flumazepil eine leicht anxiogene Wirkung und klassifizieren es deshalb als inversen Agonisten.

Weiterhin wird postuliert, es gäbe mehrere Arten von Benzodiazepin-Rezeptoren (BZ_1 und BZ_2 Rezeptoren) mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften, die im Gehirn topographisch unterschiedlich verteilt seien (Sieghart und Karobath, 1980). Wenn das zutrifft, müssen die Bindungseigenschaften dieser Subtypen sehr ähnlich sein; was aber verschieden sein kann, ist die Art, wie die Bindungsstellen in die Effektorsequenz eingeschaltet sind, die den GABA-Rezeptor beeinflußt. So wäre es möglich, daß ein Ligand an einem dieser Rezeptor-Subtypen als schwacher partieller Agonist wirkt, an einem anderen dagegen als schwacher partieller Antagonist (Martin, 1984).

Die Existenz einer solchen Heterogenität von Benzodiazepin-Rezeptoren ist jedoch noch umstritten (Martin et al., 1982).

In der letzten Zeit wurden gemischt agonistisch-antagonistisch wirkende Substanzen entdeckt. Man muß abwarten, ob es gelingt, mit Hilfe von biochemischen und autoradiographischen Methoden deren Art von Interaktion mit dem Rezeptor von der bekannter Agonisten und Antagonisten zu differenzie-

ren (Richards und Möhler, 1984).

Es wäre sicher auch von klinischem Interesse, durch weitere Versuche mit diesen partiellen Agonisten ein besseres Verständnis oder sogar eine Differenzierung der sedativen, anxiolytischen und antikonvulsiven Wirkungsmechanismen der Benzodiazepine zu erreichen.

2.2 Flumazepil (Ro 15-1788)

Flumazepil, ein Vertreter der Imidazobenzodiazepine, ist ein weiß-gelbliches, kristallines Pulver. Das Molekulargewicht beträgt 303,30, der Schmelzpunkt liegt bei 200°C. Der chemische Name lautet Ethyl-8-fluoro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo-(1,5-a)(1,4)benzodiazepine-3-carboxylat. Es ist in Wasser und in organischen Lösungmitteln nur schlecht löslich.

Die ersten Versuche mit dem spezifischen Benzodiazepinantagonisten Flumazepil machten Hunkeler et al. (1981). Sie zeigten, daß Flumazepil kompetitiv die Bindung von ^{3}H-Diazepam und ^{3}H-Flunitrazepam in einer synaptosomalen Fraktion des Cortex cerebralis von Ratten hemmt, und zwar dosisabhängig.

In einer umfassenden Studie über diesen Antagonisten kamen Bonetti et al. (1982) nach Versuchen an Affen, Ratten und Hunden zu der Ansicht, Flumazepil sei (1) ein Stoff mit hervorragender akuter und subakuter Verträglichkeit, (2) frei von benzodiazepinähnlicher (agonistischer) Wirksamkeit, (3) in normaler Dosierung frei von anderer pharmakologischer Wirkung, besonders prokonvulsiver Art und (4) ein sehr potenter und selektiver Antagonist aller bekannten pharmakologischen Effekte von Benzodiazepinen. Es sei somit zu erwarten, daß sich mit Flumazepil bei gegenüber Benzodiazepinen toleranten und physisch abhängigen Tieren Entzugserscheinungen auslösen ließen.

Die Wirksamkeit von Flumazepil in Human- und Tiermedizin wurde bereits klinisch untersucht. Eine sofortige Beendigung der sedativen Wirkung von Benzodiazepinen beim Menschen (Darragh et al., 1982) und bei Rindern (Beglinger et al., 1982) ist möglich. Auch das bei Benzodiazepin-Vergiftungen auftretende Koma konnte durch eine Injektion des Antagonisten aufgehoben werden (Scollo-Lavizzari, 1983). Der Wirkungsmechanismus von Flumazepil läßt sich durch das unter Abschnitt 2.1.3 beschriebene Modell der Interaktionen am Benzodiazepin-Rezeptor erklären. Es reagiert im gesamten Zentralnervensystem mit diesen Rezeptoren mit der gleichen Affinität wie die Benzodiazepine selbst (Richards und Möhler, 1984), jedoch nicht mit den nicht-neuronalen Bindungsstellen im ZNS und in der Peripherie (Möhler und Richards, 1981; Richards et al., 1982).

Autoradiographisch läßt sich nachweisen, daß die Bindungsstellen von ^{3}H-Flumazepil im ZNS mit denen von ^{3}H-Clonazepam identisch sind (Richards und Möhler, 1984).

Neuere Untersuchungen haben jedoch auch einen partiellen Agonismus von Flumazepil am Benzodiazepin-Rezeptor gezeigt. Vellucci und Webster (1983, 1984) und Kaijima et al. (1983) beschreiben Versuche an Mäusen und Katzen, mit denen sie nachweisen, daß Flumazepil eine antikonvulsive Wirkung besitzt und so nicht als reiner Antagonist betrachtet werden kann. Diese Wirkung zeigt sich jedoch erst bei relativ hohen Dosen. So war bei Mäusen eine Erhöhung der Krampfschwellen für Pentetrazol, Bicucullin und das konvulsiv wirkende Bezodiazepin Ro 5-3663 erst bei 50 mg/kg i.p. signifikant, bei Katzen unterdrückte Flumazepil nach einer Dosis von 2-8 mg/kg s.c. generalisierte Krämpfe durch eine minimale konvulsive Dosis von 25-35 mg/kg Pentetrazol, es blockierte jedoch nicht die Wirkung höherer Dosen (35-45 mg/kg).

Zur Antagonisierung von Benzodiazepin-Effekten bei Tieren sind dagegen nur Mengen von wenigen mg/kg nötig. Rosenberg und Chiu (1982b) gaben 2-100 mg/kg Flumazepil direkt in den

Magen, um bei Katzen Entzugserscheinungen nach Flurazepam auszulösen. Dabei waren jedoch die antagonistischen Effekte bei allen Dosierungen ähnlich, nur nahm mit steigender Dosierung die Dauer der Wirkung zu. Ebenfalls durch direkte Applikation in den Magen über eine Sonde lösten McNicholas und Martin (1982) Entzugserscheinungen bei Diazepam-abhängigen Ratten aus, wobei die Intensität der Symptome bei einer Gabe von 1-15 mg/kg Flumazepil mit der Dosierung stieg.

Bei intramuskulärer Applikation ist es möglich, mit 5 mg/kg bei Diazepam-abhängigen Affen Entzugserscheinungen auszulösen (Lukas und Griffiths, 1984).

Doenicke et al. (1984) beschreiben als einzige Versuche, in denen Flumazepil intravenös verabreicht wurde. Bei menschlichen Probanden konnte eine zuverlässige Antagonisierung von 0,03 mg/kg Flunitrazepam schon durch eine i.v. Injektion von 0,05-0,15 mg/kg Flumazepil erreicht werden.

2.3 Pentetrazol

Pentetrazol ist ein weißes, kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt von 57-60°C. Es ist gut in Wasser und in organischen Lösungsmitteln löslich. Außerdem wird Pentetrazol unabhängig von der Applikationsart schnell resorbiert und verteilt sich im Gesamtkörperwasser (Esplin und Woodbury, 1956; Vohland und Koransky, 1972). Die Halbwertszeit von Pentetrazol beim Hund beträgt 1,2 h (Jun, 1976).

Pentetrazol ist ein gebräuchlicher Stoff für das Screening antikonvulsiver Arzneimittel. Eine Beschreibung verschiedener experimenteller Modelle erfolgte durch Stone (1972).

Obwohl die Wirkungen von Pentetrazol lange bekannt sind, ist sein genauer Wirkungsmechanismus noch nicht voll geklärt. Die durch Pentetrazol ausgelösten Konvulsionen unterscheiden sich von den durch Strychnin induzierten, ähneln

aber den von Picrotoxin hervorgerufenen (Woodbury, 1980). Zwar werden von Pentetrazol eine Vielzahl anderer Wirkungen beschrieben (z.B. Woodbury, 1980), es scheint aber doch wahrscheinlich, daß es über eine Verminderung der GABA-vermittelten inhibitorischen Transmission im ZNS wirkt. Man weiß, daß Pentetrazol (1) die GABA-vermittelten Reaktionen in Kulturen von Säugetierneuronen hemmt (MacDonald und Barker, 1977), (2) die Dauer des inhibitorischen postsynaptischen Potentials in olfaktorischen Rindenzellen verkürzt (Scholfield, 1980), (3) Wirkungen von GABA im Nucleus caudatus reduziert (Simmonds, 1978, 1982) und (4) den durch Neurotransmitter (auch durch GABA) induzierten Chloridfluß blockiert (Pellmar und Wilson, 1977). Durch Pentetrazol induzierte Krämpfe werden durch Benzodiazepine antagonisiert, von denen man weiß, daß sie die GABAerge Transmission im ZNS erleichtern.

Es wurde auch gezeigt, daß Pentetrazol die Bindung von Benzodiazepinen kompetitiv hemmt (Muller et al., 1978; Maragons et al., 1979; Rehavi et al., 1982), wenn auch erst in Konzentrationen, die höher sind als die effektive konvulsive Dosis (Simmonds, 1978; Muller et al., 1978).

Eine neuere Veröffentlichung von Ramanjaneyulu und Ticku (1984) beschreibt Ergebnisse, die darauf hindeuten, daß Pentetrazol Krämpfe durch Angriff an der Pikrotoxin-empfindlichen Bindungsstelle des Benzodiazepin-GABA-Rezeptor-Ionophoren-Komplexes hervorruft.

2.4 Toleranz

Unter Toleranz versteht man, daß bei regelmäßiger Zufuhr eines Arzneimittels höhere Dosen notwendig werden, um die initiale therapeutische Wirkung aufrecht zu erhalten.

Diese Toleranz kann zwei Ursachen haben, nach denen man zwischen metabolischer und funktioneller Toleranz unter-

scheidet. Bei der metabolischen Toleranz liegt dem Wirkungsverlust eine gesteigerte metabolische Inaktivierung zugrunde, die funktionelle Toleranz hat ihre Ursache in zentralen Adaptationsvorgängen.

Über Toleranzentwicklung im Laufe einer antiepileptischen Behandlung mit Benzodiazepinen wurde von Browne (1973) berichtet. Außer metabolischer und funktioneller Toleranz nennt er noch folgende Möglichkeiten, die zu einer Verringerung der antikonvulsiven Wirkung dieser Arzneimittel führen können: (1) Variabilität der Anfallshäufigkeit, (2) "non compliance", d.h. unregelmäßige Einnahme des Medikaments durch den Patienten, (3) Wachstum des Patienten, das die relative Dosierung verringert, und (4) Metaboliten, die mit der antikonvulsiven Wirkung des verabreichten Medikaments interferieren. Die Möglichkeiten (1)-(3) stellen dabei keine wirkliche Toleranz dar, sie können aber eine solche vortäuschen, wenn die Plasmakonzentrationen des Medikaments während der Behandlung nicht überwacht werden und eine Anpassung der Dosierung an wechselndes Körpergewicht nicht vorgenommen wurde. Eine Toleranz gegenüber der antikonvulsiven Wirkung von Benzodiazepinen scheint häufig vorzukommen und wurde oft beschrieben. In einer Übersichtsarbeit über die Bedeutung der Benzodiazepine bei der Behandlung der Epilepsie fanden Browne und Penry (1973) 222 Fälle von Toleranzentwicklung gegenüber Diazepam, Nitrazepam und Clonazepam in 20 Veröffentlichungen. Sie entwickelte sich in 8-52% der behandelten Patienten innerhalb von wenigen Tagen bis hin zu 18 Monaten.

In einer Studie über Clonazepam (Browne, 1976) wurde eine Toleranz gegenüber der antiepileptischen Wirkung bei verschiedenen Formen der Epilepsie bei 11-100% der Patienten beschrieben. Bei einem Drittel der tolerant gewordenen Epileptiker konnte selbst nach Dosissteigerungen keine Anfallsfreiheit mehr erreicht werden. Der Zeitpunkt des Auftretens der Toleranz lag zwischen einem und sechs Monaten nach

Behandlungsbeginn. Ähnlich Ergebnisse werden auch von anderen Autoren berichtet (Bergami et al., 1970; Dumermuth und Kovacs, 1974; Kick und Dreyer, 1973; Masland, 1975). In einem zusammenfassenden Bericht beschrieben Kruse und Blankenhorn (1973) einen progressiven Wirkungsverlust von Clonazepam gegen verschiedene Formen kleiner epileptischer Anfälle. Sie fanden einen Abfall der positiven Wirkung (vollständige Anfallsfreiheit oder mindestens eine 50%ige Reduktion) von 62% im ersten Monat über 34% nach sechs Monaten bis zu einem Wert von 14% nach 2,5jähriger Behandlung. Für die Behandlung von myoklonisch-astatischen Anfällen wurden ähnliche Werte angegeben, während beim Grand Mal und/oder bei tonischen Anfällen Besserungen nur in einem geringeren Prozentsatz auftraten. Bei diesen Anfallstypen wurde anfangs nur bei 41% der Patienten eine ausreichende Wirkung mit Clonazepam erzielt. Schon nach 6-12 Monaten war eine völlige Wirkungslosigkeit zu beobachten, die auch durch höhere Dosen nicht zu beheben war. Rossi et al. (1973) stellten bei der Behandlung von Patienten mit generalisierter Epilepsie schon nach einer Woche Wirkungsverlust fest, der nach einem Monat vollständig war.

Metabolische Toleranz:
Diese Form der Toleranz scheint bei der Behandlung mit Benzodiazepinen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Das liegt wahrscheinlich an den normalerweise sehr geringen Dosen, die bei der Therapie der Epilepsie verabreicht werden, so daß eine Enzyminduktion nicht vorkommen sollte (Klotz et al., 1976; Greenblatt und Shader, 1978).

Funktionelle Toleranz:
Killam et al. (1973) führten die ersten experimentellen Untersuchungen mit Benzodiazepinen über die Entwicklung einer funktionellen Toleranz durch. In einer Studie an Affen zeigten sich, daß im Laufe einer 2-4monatigen Behandlung die

antikonvulsive Wirksamkeit von Diazepam und Clonazepam abnahm, so daß zur Anfallskontrolle bei Diazepam eine 8-16fache und bei Clonazepam eine 4fache Dosissteigerung nötig wurde. Frey et al. (1984) beschreiben eine Verringerung der antikonvulsiven Wirkung von Diazepam bei Hunden schon nach einer Woche oraler Behandlung trotz unveränderter oder sogar höherer Plasmakonzentrationen.

Die Entstehung dieser Toleranz wurde durch eine Änderung der Benzodiazepin-Rezeptoreigenschaften erklärt. So wurden in Arbeiten von Chiu und Rosenberg (1978) und Rosenberg und Chiu (1981) Änderungen der maximalen Bindungskapazität für Benzodiazepine im ZNS nachgewiesen. Dazu wurden Ratten mit relativ hohen Dosen Flurazepam behandelt, und es trat eine 15-20%ige Reduzierung der Bindungskapazität auf, die allerdings schon 24 h nach dem Ende der Behandlung auf den Ausgangswert zurückging. Bei einer ähnlichen Studie mit Flurazepam an Katzen wurde von den gleichen Autoren (Rosenberg und Chiu, 1982a) eine Toleranz nach fünf Wochen Behandlung beschrieben. Die Dosis mußte um das 10fache gesteigert werden, um die gleichen Wirkungen wie zu Beginn der Behandlung zu erzielen. Lister et al. (1983) beschreiben die Entwicklung einer Toleranz gegenüber Lorazepam bei Ratten, die schon nach dreitägiger Behandlung auftrat. Der Mechanismus, der dem Entstehen dieser Toleranz zugrunde liegt, wird bei diesen Versuchen zwar nicht untersucht, die Autoren vermuten allerdings auch eine verminderte Bindungskapazität auf zellulärer Ebene und damit eine funktionelle Natur der Toleranz.

Crawley et al. (1982) zeigten eine Abnahme der Bindungsstellen in Abhängigkeit von der Wirkungsstärke der verwendeten Benzodiazepine. Die Abnahme der maximalen Bindungskapazität für ^{3}H-Diazepam war bei Mäusen nach einer 3wöchigen intraperitonealen Behandlung nach Clonazepam stärker ausgeprägt und hielt länger an als nach Chlordiazepoxid.

Sher (1983) behandelt in einem Experiment zur Klärung

dieser Mechanismen Kulturen des Cortex cerebralis von Mäusefeten mit Diazepam. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Verringerung der Benzodiazepinbindung nach chronischer Exposition gegenüber klinisch relevanten Doses des Medikamentes. Auch eine Reduktion des neuronalen Anteils der Rezeptoren nach akuter und chronischer Exposition konnte gezeigt werden. Diese Reduktion hielt nach der Behandlung mit Diazepam unterschiedlich lange an.

Gallagher et al. (1984) beschreiben elektrophysiologische Hinweise auf eine verminderte postsynaptische Empfindlichkeit gegenüber GABA nach einer längeren Behandlung mit Benzodiazepinen, die durch direkte iontophoretische Applikation von GABA und Serotonin in serotoninerge Zellen des dorsalen Nucleus raphe gemessen wurde. Die verminderte Empfindlichkeit erwies sich dabei als dosisabhängig und trat nach mindestens dreiwöchiger Behandlung mit Diazepam auf. Weiterhin zeigte sich bei diesen Messungen, daß eine akute Injektion des Benzodiazepinantagonisten Flumazepil die verminderte Empfindlichkeit gegenüber GABA rasch aufhebt.

Akute Toleranz:

Unter akuter Toleranz versteht man das Entwickeln eines Wirkungsverlustes innerhalb von sehr kurzer Zeit, einigen Minuten bis mehreren Stunden. Das bedeutet, die Wirkung eines applizierten Arzneimittels hört bei einer höheren Plasmakonzentration auf als derjenigen, bei der sie zu Beginn der Behandlung einsetzte. Dieses Phänomen wurde bei der Behandlung des Status epilepticus mit Diazepma beschrieben (Parsonage und Norris, 1967). Dabei zeigte sich bereits am ersten Tag der Behandlung ein Wirkungsverlust, der auch durch weitere Diazepam-Injektionen nicht beseitigt werden konnte. Barnett und Fiore (1971, 1973) untersuchten bei Katzen die antagonistischen Wirkungen von Diazepam auf Reflexe und die depressive Wirkung auf Amplituden im EEG. Eine Toleranz wurde gefunden, als ansteigende Diazepam-Dosen in

Intervallen von mehr als 15 Minuten intravenös injiziert wurden. Als Ursache dieser akuten Toleranz nahmen die Autoren bei Diazepam dessen Verdrängung vom Rezeptor durch den ebenfalls wirksamen, kumulierenden Hauptmetaboliten N-Desmethyldiazepam an. Die antikonvulsive Wirkung von N-Desmethyldiazepam beträgt etwa ein Fünftel derer von Diazepam (Frey und Löscher, 1982). Da die Affinität von N-Desmethyldiazepam zum Benzodiazepin-Rezeptor sehr hoch ist, kann man so die Abnahme der antikonvulsiven Wirksamkeit erklären. Als die Tiere nur mit N-Desmethyldiazepam behandelt wurden, zeigte sich auch keine akute Toleranz.

Mit einem experimentellen Modell, bei dem durch eine Pentetrazol-Infusion bei Hunden ein Status epilepticus aufrechterhalten wurde, konnten Frey et al. (1984) nach 4-5maliger i.v. Injektion von Diazepam bei 2 von 6 Hunden eine akute Toleranz nachweisen. Als dieselben Untersuchungen nur mit N-Desmethyldiazepam durchgeführt wurden trat keine Toleranz auf.

2.5 Abhängigkeit

Der Begriff "Sucht" ist wegen seiner Unschärfe und Mehrdeutigkeit durch den von der WHO vorgeschlagenen Begriff der Arzneimittelabhängigkeit ersetzt worden. Er kennzeichnet einen psychischen und gegebenenfalls auch physischen Zustand, der sich aus der Wechselwirkung zwischen einem Individuum und einer Droge ergeben kann. Dabei wird zwischen einer psychischen und physischen Abhängigkeit unterschieden.

Es gibt mehrere Arzneimitteltypen, die zur Abhängigkeit führen können (z.B. Morphin, Barbiturate, Alkohol, Cocain u.v.a.), und alle führen zur psychischen Abhängigkeit, d.h. bei den Konsumenten besteht ein Drang oder sogar ein unwiderstehlicher Zwang, das Pharmakon wieder einzunehmen. Physische Abhängigkeit liegt vor, wenn sich ein spezifisches

Entzugssyndrom nach Absetzen der verwendeten Substanz ausbildet. Es tritt nur bei Alkohol, Morphin und morphinähnlichen Analgetika sowie einer Gruppe von zentral dämpfenden Pharmaka auf (Barbiturate, Tranquillantien). Die Möglichkeit der Entwicklung einer physischen Abhängigkeit von sedativen und hypnotischen Drogen ist bekannt und beschrieben (Smith, 1977). Zeichen einer physischen Abhängigkeit von Benzodiazepinen wurden häufig bei psychiatrischen Patienten nach dem Absetzen oder bei mißbräuchlicher Benutzung beobachtet. Bei den relativ niedrigen Dosen, die bei der Epilepsiebehandlung verabreicht werden, wird sie seltener gesehen.

Die erste Veröffentlichung, in der eine Abhängigkeit von Benzodiazepinen beschrieben wird, stammt von Hollister et al. (1961). Sie verabreichten 36 Patienten Chlordiazepoxid, das 1960 auf den Markt gekommen war. Die Dosis betrug 100-600 mg täglich, das ist das 8-20fache der normalen therapeutischen Dosis, 1-7 Monate lang. Elf der Patienten erhielten dann statt Chlordiazepoxid Placebo und zehn von diesen Personen zeigten daraufhin subjektive oder objektive Symptome, die als Entzugserscheinungen betrachtet werden konnten (Depressionen, Verschlechterung bestehender Psychosen, Schlaflosigkeit bzw. Übererregbarkeit, Anorexie, Myoklonien und Konvulsionen). All diese Symptome traten hauptsächlich zwischen dem 4. und 8. Tag nach dem Absetzen der Behandlung auf und verschwanden nach dem 10. Tag.

Alle von 1961 bis 1977 in der gesamten medizinischen Literatur veröffentlichten Fälle einer Benzodiazepin-Abhängigkeit hat Marks (1977) in einer Übersichtsarbeit zusammengefaßt. Er fand in diesem Zeitraum 118 Veröffentlichungen mit insgesamt 458 gesicherten Fällen. Marks unterscheidet dabei nach Abhängigkeiten, die aus mißbräuchlicher Anwendung (267 von Diazepam, 238 von Chlordiazepoxid und 2 von Nitrazepam) und solchen, die aus therapeutischer Dosierung entstanden sind (41 von Diazepam, 5 von Nitrazepam und je eine von Oxazepam, Lorazepam und Flurazepam).

Die erste Beschreibung einer experimentell erzeugten Abhängigkeit von Benzodiazepinen stammt von Yanagita und Takahashi (1973), die nach chronischer, hochdosierter Chlordiazepoxid- und Diazepam-Gabe bei Affen Konvulsionen nach dem Entzug beschrieben und Yanaura et al. (1975), die nach Diazepam-Gabe bei Ratten Gewichtsverlust fanden.

Martin et al. (1982) erzeugten bei Ratten eine Abhängigkeit von Diazepam. Sie fanden nach dem Entzug bei Dosen von 100-133 mg/kg Verhaltensänderungen und Übererregbarkeit. Rosenberg und Chiu (1982b) berichten von einem Abstinenzsyndrom bei Katzen, das nach 5wöchiger Behandlung mit Flurazepam durch den Benzodiazepin-Antagonisten Flumazepil ausgelöst werden konnte. Dabei zeigten die Katzen 15 Minuten nach der Gabe des Antagonisten Tremor der Extremitäten und des Schweifes, Piloerektion und einen erhöhten Skelettmuskeltonus. Außerdem hatten einige Katzen verstärkte Salivation und alle erhöhte Atemfrequenzen. Keines der Tiere fraß während der Dauer dieser Symptome.

1983 beschreiben Ryan und Boisse das Modell einer Chlordiazepoxid-Abhängigkeit bei Ratten. Sie fanden als Entzugserscheinungen eine Übererregbarkeit der Tiere. Als sichtbare Zeichen fanden sie Zuckungen, Tremor, Hypertonie der Muskeln, aufgekrümmten Rücken und aufgerichteten Schweif, Zähneklappern und Gewichtsverlust. Es traten aber keine spontanen Krampfanfälle auf.

McNicholas et al. (1983) zeigen, daß bei Hunden nach chronischer Gabe von 60 mg/kg Diazepam und 100 mg/kg Lorazepam pro Tag über mindestens zwei Wochen Entzugserscheinungen auftreten. Diese Menge wurde in 4 täglichen Dosen direkt über eine implantierte Magensonde verabreicht. Der gleiche Versuch wurde vorher mit Dosen von 100-133 mg/kg/d Diazepam bei Ratten durchgeführt (McNicholas et al., 1982). Als Entzugserscheinungen wurden bei Hunden bei beiden Benzodiazepinen Tremor, "hot foot walking", Unbeweglichkeit und verminderte Futteraufnahme beobachtet, bei Ratten traten Zuckun-

gen, Tremor, "wet dog shakes", verminderte Futter- und Wasseraufnahme und Gewichtsverlust auf.

Lukas und Griffiths (1984) führten Versuche mit Affen durch, die sie bis zu 35 Tagen lang mit 0,125-20 mg/kg Diazepam pro Tag behandelten. Sie fanden, daß Entzugserscheinungen wie unphysiologische Körperhaltungen, Tremor, Konvulsionen, Gähnen, Lippenlecken, Nasenreiben auftraten, wenn die Behandlung beendet wurde und die Affen mit 0,25 mg/kg/d mindestens 7 Tage und mit 20 mg/kg/d mindestens 3-7 Tage gedauert hatte. Auch diese Autoren konnten mit 5 mg/kg Flumazepil intragastrial die Entzugserscheinungen auslösen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Methodik

3.1.1 Tiermaterial

Die Versuche zur Untersuchung der subakuten und akuten Toleranz wurden an 10 klinisch gesunden Hunden unterschiedlicher Rassen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Das Alter der Tiere lag zwischen einem und 5 Jahren, ihr Gewicht bei 12 bis 23 Kilogramm. Die Hunde waren tagsüber in einem ca. 8 m^2 großen Außenzwinger und nachts in einem ca. 4 m^2 großen Innenzwinger untergebracht. Sie hatten Wasser zur freien Verfügung und wurden täglich um 14 Uhr mit einer dem jeweiligen Gewicht entsprechenden Menge des Fertigfutters "Royal Canin - Meute mit Gemüse" gefüttert.

Die Versuche zur Untersuchung einer physischen Abhängigkeit wurden in den Zentralen Tierversuchslaboratorien der Freien Universität Berlin (ZTL) durchgeführt. Als Versuchstiere dienten je drei männliche und weibliche, zu Beginn des Versuches ca. 1 Jahr alte Foxhound-Boxer-Bastarde (FBI-Hunde aus den Tier-Laboratorien von Boehringer, Ingelheim), die zwischen 22 und 35 kg wogen. Während des Versuches wurden die Tiere in einem voll klimatisierten, abgeschlossenen Raum in ca. 5 m^2 großen Zwingern einzeln gehalten. Sie kamen täglich zur Beobachtung und zum Auslauf in einen ebenfalls abgeschlossenen Nebenraum von ca. 15 m^2, in dem sie mindestens 3 h lang frei laufen konnten. Die Temperatur beider Räume lag bei 20 $\pm$2°C, die Luftfeuchtigkeit betrug etwa 55%. Die Hunde hatten ebenfalls Wasser zur freien Verfügung und wurden jeden Tag um 12 Uhr mit ca. 900 g Altromin^R-4134 Futterpellets gefüttert.

Alle Versuchstiere erhielten mindestens drei Wochen vor und während der Dauer des Versuches keine anderen Medikamente.

3.1.2 Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Clonazepam (Rivotril^{R})	Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Flumazepil (Ro 15-1788)	Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Glycofurol	Desitin Werk, Carl Klinke GmbH, Hamburg
Heparin-Na	Leo-Pharmaceutical Prod., Ballerup, Dänemark
Ketamin-Hydrochlorid (Ketavet^{R})	Parke-Davis, München
N-Desmethyldiazepam	Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Pentetrazol	Knoll AG, Ludwigshafen
Piritramid (Dipidolor^{R})	Janssen GmbH, Düsseldorf
Propionyl-Promazin (Combelen^{R})	Bayer AG, Leverkusen
Succinylcholin (Succinyl-Asta^{R})	Asta Werke, Brackwede
Xylazin (Rompun^{R})	Bayer AG, Leverkusen

Alle verwendeten Reagenzien waren analysenreine Substanzen der Firma E. Merck, Darmstadt.

Für die Überlassung von Heptamethylentetrazol (HMT) bedanken wir uns bei Dr. W.D. Yonekawa, Epilepsy Branch, NINCOS, National Institute of Health, Maryland. Die Reinsubstanzen von Clonazepam, Flumazepil und N-Desmethyldiazepam wurden uns freundlicherweise von der Hoffmann La Roche AG zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung einer Injektionslösung von Flumazepil wurden 60 mg der Reinsubstanz in 3 ml Glycofurol unter Erwärmen auf einem Magnetrührer gelöst. Danach wurden zur Verdünnung noch 3 ml Aqua bidest. vorsichtig tropfenweise zugegeben, so daß eine 1%ige Flumazepil-Lösung entstand. Diese Lösung mußte innerhalb einer Stunde nach Herstellung injiziert werden, da nach dieser Zeit Flumazepil als Niederschlag ausfiel.

3.1.3 Versuche zum Nachweis der Toleranz bei subakuter Behandlung

Für den Nachweis einer Toleranz bei subakuter Behandlung wurden sechs Hunde mehrere Wochen lang mit Clonazepam behandelt (siehe Abb.3).

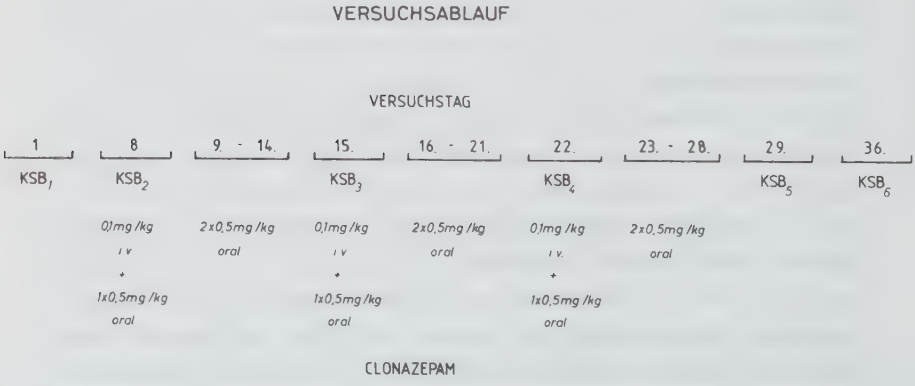


Abb.3: Schema des Versuchsablaufes

3.1.3.1 Bestimmung der Krampfschwellen

Die Krampfschwellen wurden am ersten Tag des Versuches und dann während der Dauer der Behandlung in wöchentlichen Abständen bestimmt, zusätzlich noch einmal 24 h und eine Woche nach dem Absetzen.

Zur Darstellung der Toleranz verwendeten wir bei unserem Versuch die Krampfschwelle für intravenös infundiertes Pentetrazol. Die Konzentration der wäßrigen Pentetrazol-Lösungen war jeweils so eingestellt, daß der betreffende Hund eine Menge von 10 mg/kg Pentetrazol pro Minute erhielt. Die Applikation erfolgte mittels einer Infusionspumpe (Sage Instruments Inc., Modell 351) über einen ca. 1 m langen PVC-Schlauch in die rechte V.cephalica antebrachii. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 3 ml/min. Die Zeit vom Beginn der Infusion bis zum Auftreten einer ersten generalisierten Zuckung, des initialen Klonus, wurde mit einer Stoppuhr gemessen. Der Gesamtverbrauch an Pentetrazol wurde aus der Infusionszeit berechnet und pro Kilogramm Körpergewicht als Krampfschwellenwert (KSW) dargestellt.

3.1.3.2 Behandlung mit Clonazepam und Versuchsbeschreibung

Nach der Bestimmung der Ausgangskrampfschwelle am ersten Tag des Versuches am unbehandelten Hund erfolgte eine zweite am 8. Tag nach der intravenösen Injektion einer wirksamen Dosis von Clonazepam, um die akute Wirkung des Arzneimittels zu fixieren. Dazu wurde dem Hund 0,1 mg/kg Clonazepam in Form der handelsüblichen Rivotril^{R}-Injektionslösung i.v. verabreicht.

Vor dieser Injektion wurde von dem Tier, das während der gesamten Dauer des Versuches in Brust-Bauch-Lage auf einem Versuchstisch lag, noch eine O-Blutprobe genommen. Zehn

Minuten nach der Clonazepam-Injektion wurde wieder eine Blutprobe entnommen und sofort anschließend mit der Pentetrazol-Infusion begonnen. Nach dem Auftreten des initialen Klonus wurde eine weitere Blutprobe genommen. Aus diesen Proben wurde nach der gaschromatographischen Bestimmung der Plasmakonzentration von Clonazepam die aktuelle Plasmakonzentration zum Zeitpunkt des Auftretens dieser ersten generalisierten Zuckung durch Interpolation errechnet.

Aus weiteren Blutproben, die 30 Minuten, 1, 2 und 3 Stunden nach der Clonazepam-Injektion entnommen wurden, berechneten wir die Halbwertszeit nach jeder Krampfschwellenbestimmung. Regressionsgeraden wurden auf einem elektronischen Tischrechner (Canon Canola F-20 P) berechnet.

Am 8. Tag wurde um 20 Uhr abends mit der oralen Behandlung begonnen (siehe Abb.3). Die Dosis wurde aufgrund vorausgegangener Untersuchungen an unserem Institut über die Pharmakokinetik von Clonazepam beim Hund gewählt. Nach Al-Tahan et al. (1984) lassen sich mit einer oralen Applikation von 0,5 mg/kg in Abständen von 12 Stunden (8 Uhr und 20 Uhr) Plasmakonzentrationen aufrechterhalten, wie sie vom Menschen her als therapeutisch bekannt sind (25-75 ng/ml Plasma, Eadie, 1984). Das Medikament wurde den Hunden oral in Form von Rivotril^{R}-Tabletten (2 mg und 0,5 mg pro Tablette) verabreicht. Um eine teilweise verzögerte Resorption und damit mehrgipflige Plasmakonzentrationskurven zu vermeiden, wurde die entsprechende Menge an Tabletten in Gelatinekapseln gefüllt.

In wöchentlichen Abständen wurde dann wieder die Testdosis Clonazepam injiziert und 10 Minuten danach die Krampfschwellenbestimmung wie unter Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben durchgeführt.

Durch den Vergleich der Krampfschwellen einerseits und der dazugehörigen Clonazepam-Konzentrationen im Blut andererseits ist man in der Lage, eine quantitative Aussage über die Entwicklung einer Toleranz zu treffen. Auch die Klärung

der Natur dieser Toleranz ist durch die Bestimmung der Halbwertszeiten möglich.

Die Behandlung wurde beendet, wenn die Entwicklung einer Toleranz ersichtlich war, spätenstens aber nach sechs Wochen.

3.1.4 Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz

3.1.4.1 Versuchsvorbereitungen

Einen Tag vor dem eigentlichen Versuch wurden dem Hund 4 Elektroden zur Abnahme des EEG inplantiert. Es handelte sich dabei um zwei Platten- und zwei Schraubelektroden. Als Schraubelektroden dienten V4A Corticalisschrauben mit einem Außendurchmesser von 3,5 mm, bei denen im Innensechskantkopf für die Befestigung des Ableitkabels eine Bohrung von 0,8 mm angebracht worden war. Die Fußplatte der Plattenelektroden bestand ebenfalls aus V4A Stahl mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Dicke von 0,5 mm. Das Mittelstück war ein mit PVC isoliertes, flexibles Drahtseil (V2A), auf dem Kopfstück mit einer Länge von 8 mm und der Dicke von 2 mm wurden die Kappen des Ableitkabels aufgesteckt (Philippin, 1984).

Zur Implantation wurden die Hunde mit Ketamin-Hydrochlorid (10 mg/kg) und Xylazin (2 mg/kg) anaesthesiert. Nach einem Hautschnitt und der Durchtrennung der darunterliegenden Faszie und des Periostes wurde direkt auf der Linea temporalis beiderseits der Medianen je ein Loch in die Lamina externa des Sinus frontalis gebohrt (Durchmesser 2 mm). In diesen Löchern wurden die Schraubelektroden fixiert.

Die beiden Plattenelektroden wurden auf das Periost des Os parietale aufgesetzt, und zwar ca. 1,5 cm beiderseits der Crista sagittalis ext. und etwa fingerbreit rostral der Linea nuchalis sup.. Die Temporalismuskulatur wurde dazu vorher stumpf durchtrennt. Die Fixierung der Elektroden

erfolgte mit Catgut Nr. OO bei der Naht der Muskulatur.

Die Hautwundränder wurden mit Einzelheften (Seide gefl., Nr.1) adaptiert.

Die Anordnung der Elektroden ist in Abbildung 4 dargestellt.

3.1.4.2 Versuchsdurchführung

Am Versuchstag bekamen die Hunde eine Neuroleptanalgesie mit 0,3 mg/kg Propionylpromazin und 3,0 mg/kg Piritramid. Anschließend wurde ein Endotrachealtubus eingeführt und die Tiere in die rechte Seitenlage gebracht. Nach der Einführung eines PVC-Katheters in die linke V.saphena wurden die Hunde mit 0,1 mg/kg Succinylcholin (Beagle mit 0,2 mg/kg) relaxiert. Diese Relaxation wurde während des gesamten Versuches durch eine Infusion von 0,01 mg/kg/min Succinylcholin aufrechterhalten (Frey, 1972).

Die Beatmung wurde mit einem Beatmungsgerät (Assistor 641, Drägerwerk, Lübeck) mit einem maximalen Inspirationsdruck von 18 cm H_2O durchgeführt, das Atemminutenvolumen lag zwischen 4,0 und 5,2 Litern.

Danach wurden weitere Katheter eingeführt, und zwar in die rechte V.femoralis zur Pentetrazol-Infusion, in die linke V.cephalica antebrachii zur Gabe von Clonazepam, in die linke V.jugularis zur Blutprobenantnahme und in die linke A.carotis communis zur Blutdruckmessung. Der Carotis-Katheter wurde mit einer 0,075%igen Heparin-Natrium Lösung (109,8 IU/ml in 0,9%iger NaCl-Lösung) gefüllt. Die Messung des arteriellen Blutdrucks erfolgte über einen Statham-Druckumwandler P23 Db, die Aufzeichnung wurde mit einem Thermo-Schnellschreiber (Linear Corder Mark VII, Watanabe Instruments Corp.) vorgenommen.

Die rektale Körpertemperatur und die Raumtemperatur wurden fortlaufend mit einem elektronischen Universalthermome-

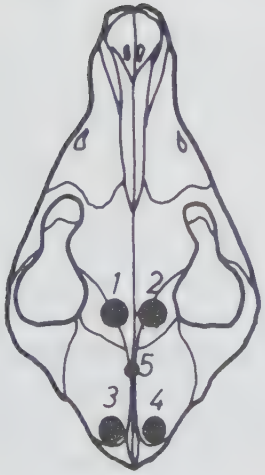


Abb.4

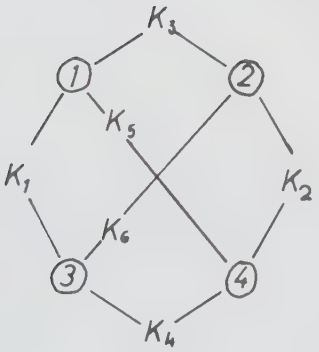


Abb.5

Abb.4: Elektrodenanordnung bei der Ableitung des EEG (nach Philippin, 1984)
1, 2: Schraubelektroden
3, 4: Plattenelektroden
5: Sitz der Erdelektrode

Abb.5: Ableitprogramm (nach Philippin, 1984)

ter (Typ TE3, Ellab-Instruments, Kopenhagen) gemessen und halbstündlich protokolliert. Die Raumtemperatur wurde je nach Körpertemperatur des Hundes zwischen 20 und 30°C gehalten.

Nach der Befestigung des Ableitkabels an den vier implantierten EEG-Elektroden und der subcutanen Fixierung der Erdelektrode wurde der EEG-Schreiber (Rectilinear Thermalwriting Oscillograph 8K20 Series, San-ei Sokki, San-ei Instrument Co., LTD Tokio) eingeschaltet. Es wurde bipolar nach der in Abbildung 5 dargestellten Anordnung abgeleitet. Ausgewertet wurden die beiden Diagonal-Ableitungen (K 5 und K6), die zur Erleichterung der Auswertung mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten aufgenommen wurden.

Mit dem eigentlichen Versuch wurde frühestens 20 min nach dem Ende der Präparation begonnen. Zur Auslösung von sichtbaren Krampfpotentialen im EEG wurde den Hunden Pentetrazol infundiert. Um charakteristische und konstante Veränderungen im EEG zu erreichen, mit deren Hilfe man die Wirkung von Clonazepam auswerten konnte, wurde versucht, einen steady-state der Pentetrazol-Konzentration im Plasma einzustellen.

Die Berechnung der Bolusdosis und der Infusionsrate (18,9 mg/kg bzw. 10,8 mg/kg/h) nach Mitenko und Ogilvie (1972) und mit Hilfe der pharmakokinetischen Werte für Pentetrazol beim Hund (Jun, 1976) ist bei Philippin (1984) genau beschrieben. Es sollte eine Plasmakonzentration von 25 µg/kg aufrechterhalten werden, was jedoch mit den errechneten Werten nicht immer zu erreichen war. Oft stieg der Plasmaspiegel leicht an.

Die initiale Dosis Pentetrazol (Bolus) wurde dem Hund als 5%ige wäßrige Pentetrazol-Lösung über einen Zeitraum von drei Minuten durch den Femoralis-Katheter verabreicht. Daran anschließend wurde an gleicher Stelle mit der Infusion der isoton eingestellten Pentetrazol-Lösung mit der berechneten Menge begonnen. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 0,3 ml/min (Infusionspumpe Modell 351, Sage Instruments Inc.).

Die erste Injektion von Clonazepam (0,05 mg/kg bei Hund Nr. 97, 0,03 mg/kg bei allen anderen) erfolgte frühestens 30 Minuten nach Beginn der Pentetrazol-Infusion. Zwischen den einzelnen Injektionen, die über den Katheter in der V.cephalica erfolgten, lagen Zeitabstände von 50 Minuten. Die Clonazepam-Gaben wurden über einen Zeitraum von 10 sec verabreicht.

Zur Kontrolle einer ausreichenden Analgesie wurde die Herzfrequenz beobachtet. Beim Überschreiten eines Wertes von 120/min wurde Piritramid (1 ml Dipidolor^{R}, d.h. 7,5 mg Piritramid-Base) nachinjiziert.

Blutprobenentnahme:
Das Blut wurde mit einer 5-ml-Einmalspritze über den Jugularis-Katheter entzogen und in Plastikreagenzgläser mit Heparin-Na-Kristallen umgefüllt. Das Blut wurde zentrifugiert und bis zur Bestimmung des Plasmagehalts von Clonazepam noch am selben Tag im Kühlschrank aufbewahrt. Bis zur Pentetrazolbestimmung wurde das Plasma dann tiefgefroren.

Beim ersten Versuch an Hund Nr. 97 wurde Blut unmittelbar vor jeder Clonazepam-Injektion und jeweils 2 und 7 Minuten danach entnommen, bei den weiteren Versuchen dann wiederum vor der Injektion, 2 und 10 Minuten danach.

3.1.4.2 Versuchsauswertung

Alle durch Pentetrazol hervorgerufenen Spike wave-Komplexe wurden 3 min vor bis 15 min (10 min bei Hund Nr. 97) nach jeder Clonazepam-Injektion auf dem EEG-Papier markiert, pro Minute gezählt und graphisch dargestellt.

Unter einem Spike wave-Komplex versteht man eine Spitze von weniger als 80 msec Dauer mit einer nachfolgenden, langsameren Welle im EEG. Die Spitze ist im Komplex der Welle in der Regel vorgelagert, sie kann aber auch im auf-

steigenden Schenkel der Welle liegen.

Aus der Zahl der Spike wave-Komplexe während des 3minütigen Vorlaufes wurde das arithmetische Mittel pro Minute berechnet (x). Die Anzahl der Spike wave-Komplexe pro Minute wurde dann über eine Zeit von 15 min (10 min bei Hund Nr. 97) nach der Injektion von Clonazepam gezählt und die prozentuale Reduktion gegenüber der nach dem Vorlaufwert zu erwartenden Anzahl während der Beobachtungsperiode berechnet.

3.1.5 Versuche zum Nachweis einer physischen Abhängigkeit

Nach dem Absetzen der oralen Behandlung bei den Versuchen zum Nachweis einer Toleranz zeigten sich bei den Hunden Symptome, die als Zeichen einer physischen Abhängigkeit interpretiert wurden. So war die Krampfschwelle bei allen Tieren 24 h nach dem Absetzen deutlich erniedrigt, 5 der 6 Hunde zeigten Anorexie mit Gewichtsverlust und bei den beiden jüngsten Tieren, die ca. 1 Jahr alt waren, war eine Hyperthermie festzustellen.

Diese Hinweise auf eine Abhängigkeit gaben Anlaß zu einer weiteren Versuchsreihe mit 6 in Alter und Gewicht vergleichbaren Hunden, die in den Zentralen Tierversuchslaboratorien Berlin durchgeführt wurde. Die drei männlichen und drei weiblichen Tiere wurden dort unter konstanten Umweltbedingungen (siehe Abschn.3.1.1) einzeln in Boxen gehalten. Blutproben zur Bestimmung des Plasmagehalts von Clonazepam wurden dort entnommen und zentrifugiert, das Plasma wurde dann in unserem Laboratorium aufgearbeitet und gaschromatographisch untersucht.

3.1.5.1 Versuchsbeschreibung

Vor Beginn der Behandlung mit Clonazepam vergingen 8 Wochen, in denen sich die Tiere an den Experimentator, eine Hilfskraft und den Tierpfleger gewöhnen konnten. Soweit wie möglich hatten keine weiteren Personen Kontakt mit den Tieren.

Die sechs Versuchshunde wurden 7 Wochen lang täglich zwei Mal mit 0,5 mg/kg Clonazepam wie unter Abschnitt 3.1.3.2 beschrieben behandelt. Die Clonazepam-Konzentration im Plasma wurde wöchentlich mindestens einmal unmittelbar vor der morgendlichen Dosis und 90 Minuten nach der Eingabe der Gelatinekapsel mit den Rivotril^{R}-Tabletten bestimmt.

Körpergewicht und Körpertemperatur wurden während der gesamten Dauer des Versuches (2 Wochen vor Beginn der oralen Behandlung, während der Behandlung und 2 Wochen danach) täglich morgens um 8 Uhr gemessen und protokolliert. Zur Bestimmung der Körpertemperatur wurde ein elektronisches Digital-Thermometer (Bosch Thermotest) verwendet.

3.1.5.1.1 Auslösen von Entzugserscheinungen durch Flumazepil

In wöchentlichen Abständen, d.h. am 1., 8., 15. usw. Tag der Behandlung wurde versucht, bei den Hunden durch Injektion des spezifischen Benzodiazepin-Antagonisten Flumazepil Entzugssymptome auszulösen. Dazu wurde jeweils einem nach der Endziffer der Ohrnummer zufällig ausgewählten Tier 1 mg/kg Flumazepil intravenös verabreicht und der Hund danach 3 Stunden lang in dem Auslauf beobachtet.

Die benötigte Menge des Benzodiazepin-Antagonisten wurde in Vorversuchen bestimmt. Dabei fanden wir, daß 1 mg/kg Flumazepil i.v. die Wirkung von 0,5 mg/kg ebenfalls i.v. injizierten Clonazepam aufzuheben vermag.

Der Antagonist wurde den Tieren 1 Stunde nach der morgendlichen Clonazepam-Dosis verabreicht und der Plasmagehalt an Clonazepam unmittelbar vor und 60 min nach der Injektion bestimmt.

3.1.5.1.2 Entzugserscheinungen nach dem Absetzen der oralen Behandlung

Die Hunde wurden zu Vergleichszwecken sowohl vor Beginn als auch während der Behandlung mit Clonazepam täglich mehrere Stunden lang in dem Auslauf beobachtet. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich nur Personen in dem Raum befanden, die den Tieren vertraut waren.

Auffallende Verhaltensänderungen im Benehmen der Versuchstiere nach dem Absetzen der Behandlung wurden während einer täglichen 6stündigen Beobachtung von 8 bis 14 Uhr registriert. Auch dabei waren nur den Tieren bekannte Personen im Raum.

3.1.5.2 Versuchsauswertung

Um auftretende Symptome während des Entzuges auch quantitativ erfassen zu können, wurde ihre Registrierung während des Beobachtungszeitraums nach einem Punkteschema bewertet. Die Punktezahl für diese Bewertung wurde in Anlehnung an Himmelbach (1939), der ein Punktsystem zur Beurteilung der Intensität von Entzugserscheinungen beim Menschen beschreibt und an McNicholas et al. (1983) gewählt, die Entzugssymptome bei Diazepam- und Lorazepam-abhängigen Hunden untersuchten (siehe Abb.6).

Als "wet dog shake" wurde ein Bewegungsablauf bezeichnet, bei dem die Hunde einen Moment innehielten und sich dann mehrmals am ganzen Körper schüttelten, so wie es nasse Hunde zu tun pflegen.

SYMPTOME	PUNKTE
Unphysiol. Verhalten	
Angst	3
Rückenlage	1-3
Mattigkeit	1-3
wet dog shakes	1-3
Tremor	1-3
Ton. klon. Anfall	20
Temperaturerh. (0,1 °C)	1
Gewichtsverlust (500 g)	1

Abb.6: Punktebewertung der Entzugserscheinungen

Die Punktezahl von 1-3 wurde bei den "wet dog shakes" je nach Anzahl, sonst nach der in Rücken- bzw. in Seitenlage ("Mattigkeit") verbrachten Zeit vergeben. Die Stärke des Tremors wurde subjektiv beurteilt.

Als Temperaturerhöhung wurde der Wert über der morgendlichen Durchschnittstemperatur der letzten beiden Behandlungswochen berechnet, als Gewichtsverlust die Verringerung des Körpergewichts gegenüber dem letzten Behandlungstag.

3.1.6 Analytik

3.1.6.1 Gaschromatographische Analyse der Plasmakonzentration von Clonazepam

Diese Bestimmung wurde nach der von Löscher und Al-Tahan (1983) beschriebenen Methode vorgenommen.

Bei der Extraktion wurden zu 200 bzw. 500 µl Plasma in einem Eppendorf-Reagenzgefäß 20 µl Acetonitril mit 5 ng N-Desmethyldiazepam als internem Standard, 200 µl Boratpuffer (1m, pH 9) und 100 µl Toluol pipettiert. Danach wurden die Gefäße verschlossen, 1 Minute auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und anschließend 2 Minuten lang mit 12.000 UpM zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5412). 50 µl des Überstandes wurden in ein Schraubverschlußgläschen überführt und von dieser Lösung 2 µl in den Gaschromatographen injiziert.

Zum Erstellen einer Eichkurve wurden bekannte Mengen Clonazepam in 20 µl Acetonitril zu 500 µl arzneimittelfreiem Plasma hinzugefügt und die Extraktion wie oben vorgenommen.

Aus den Peak-Höhen von Proben mit bekanntem Clonazepam-Gehalt, die an jedem Bestimmungstag mituntersucht wurden, und deren Vergleich mit dem internen Standard wurde der Clonazepam-Gehalt der unbekannten Proben berechnet.

Es wurde ein Varian 3700 Gaschromatograph mit einem ^{63}Ni-Elektronen-Einfang-Detektor (ECD, "electron capture detec-

tor*) verwendet. Die Säule war eine silanisierte (Dichlordimethylsilan 5% in Toluol), 1,84 m lange Glassäule mit einem Innendurchmesser von 2 mm, die mit 3% Sp 2250 auf 100/120 Supelcoport (Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania) gefüllt war. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Flußgeschwindigkeit von 35 ml/min. Die Temperatur der Säule blieb nach der Injektion eine Minute lang bei 270°C, dann wurde sie mit 50°C pro Minute auf 330°C erhöht.

Die Temperatur von Injektor und ECD lagen bei 330°C bzw. 350°C.

3.1.6.2 Gaschromatographische Analyse der Plasmakonzentration von Pentetrazol

Sie erfolgte nach der bei Philippin (1984) in Anlehnung an Yonekawa et al. (1980) beschriebenen Methode, allerdings wurde ein anderer interner Standard benutzt.

Zur Extraktion wurden 0,5 ml Plasma zusammen mit 8 ml Dichlormethan als Extraktionsmittel und 25 µg Heptamethylentetrazol (25 µg HMT in 50 µl Methanol) als internem Standard in ein 13 ml Rundglas gefüllt und mit einem Glasstopfen verschlossen.

Es folgte eine 20minütige Extraktion auf einem Horizontalschüttler. Danach wurden die Röhrchen 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert (Heraeus Labofuge I) und der wäßrige Überstand abgesaugt. Die organische Phase wurde quantitativ in ein neues Rundglas überführt und unter Stickstoff bei 60°C vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Methanol gelöst, in ein Schraubverschlußfläschchen umgefüllt und 4 µl davon in den Gaschromatographen eingespritzt.

Die Berechnung der Pentetrazol-Plasmakonzentration erfolgte durch den Vergleich der Höhen des Pentetrazolpeaks und der Peakhöhe des internen Standards mit den Peakhöhen von mitbestimmten Proben bekannten Pentetrazolgehalts. Eine

vorher ermittelte Eichkurve war bis 80 µg/ml linear.

Es wurde der gleiche Gaschromatograph und eine Säule wie zur Bestimmung von Clonazepam benutzt, nur erfolgte der Nachweis von Pentetrazol mit dem Flammenionisationsdetektor (FID). Die initiale Säulemtemperatur lag bei 130°C, wurde eine Minute lang gehalten und dann mit 50°C/min auf 230°C erhöht. Die Temperatur von Injektor und FID waren 300°C bzw. 350°C. Als Trägergas diente wieder Stickstoff, aber mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/min.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Subakute Behandlung

Die Krampfschwellen lagen am 1. Versuchstag, also vor Beginn der Behandlung mit Clonazepam, bei 13,6 ± 3,7 mg/kg Pentetrazol.

Die Ergebnisse der Krampfschwellenbestimmungen im Verlauf der Behandlung sind in Tabelle 1 und in Abbildung 7 dargestellt.

Bei allen Hunden zeigt sich zunächst der erwartete, deutliche Anstieg der Krampfschwellen gegenüber dem Ausgangswert nach der ersten Injektion von 0,1 mg/kg Clonazepam am 8. Versuchstag.

Bei Hund Nr. 68 und Nr. 102 sieht man deutlich, daß die Krampfschwellen mit zunehmender Behandlungsdauer schneller sinken als die Plasmakonzentrationen von Clonazepam. Bei Hund Nr. 102 sinkt sie am letzten Bestimmungstag sogar trotz einer sichtbar höheren Clonazepam-Konzentration (siehe Abb.7 oben). Bei diesem Hund zeigt sich auch ein totaler Wirkungsverlust von Clonazepam nach 3 Wochen Behandlung.

Die Hunde Nr. 96 und Nr. 95 haben eine in etwa gleichbleibende Krampfschwelle, obwohl die Clonazepam-Konzentrationen ansteigen (siehe Abb.7 mitte).

Hund Nr.	Versuchstag	Plasmakonz. Clonazepam [ng/ml]	Krampfschw Pentetrazol [mg/kg]	Krampfschw./ Konz. Clona.
68	1.	-	18,2	-
	8	72	63,5	0,88
	15	62	52,7	0,85
	22	60	41,3	0,69
95	1	-	16,1	-
	8.	32	37,1	1,16
	15.	33	34,6	1,05
	22.	62	30,3	0,49
	29.	73	38,2	0,52
96	1.	-	9,2	-
	8.	45	45,6	1,01
	15.	60	41,3	0,69
	22	80	41,2	0,52
97	1.	-	10,8	-
	8.	33	28,0	0,85
	15.	32	26,4	0,83
	22.	59	19,2	0,33
	29.	30	22,7	0,76
	36.	60	29,5	0,49
98	1.	-	11,0	-
	8.	50	29,7	0,59
	15.	105	31,3	0,30
	22.	99	29,4	0,30
	29	66	33,6	0,51
	36.	58	26,3	0,45
	43.	57	21,4	0,38
102	1.	-	16,0	-
	8.	40	35,0	0,88
	15	39	26,6	0,68
	22.	38	21,1	0,56
	29.	58	16,9	0,29

Tab.1: Krampfschwellenwerte, Plasmakonzentrationen von Clonazepam und der Quotient aus beiden bei den einzelnen Hunden im Verlauf der Behandlung.

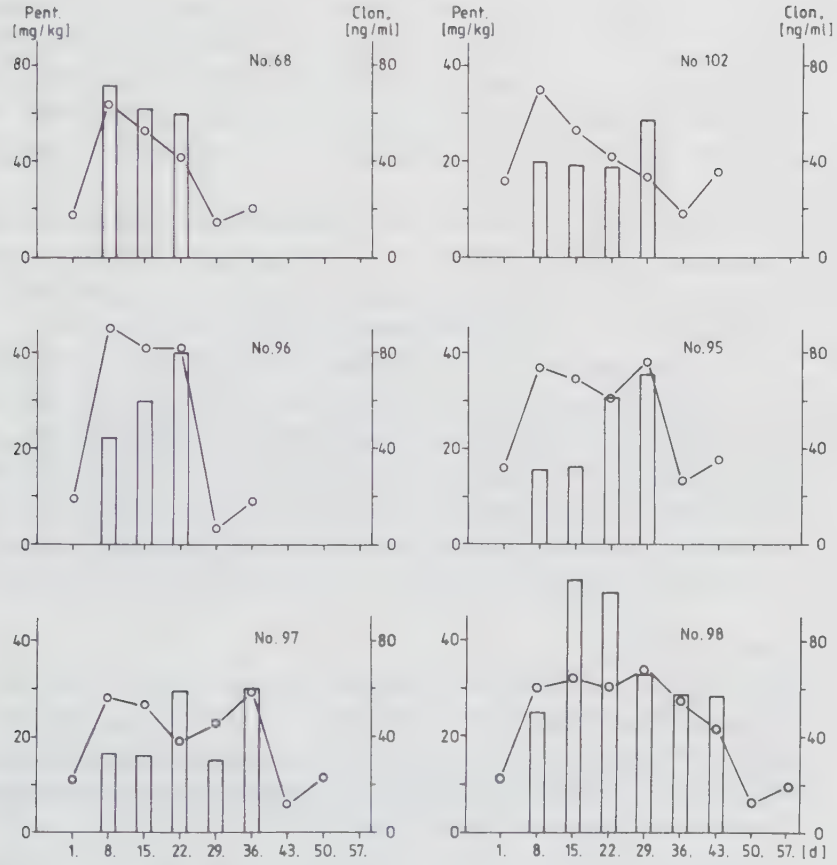


Abb.7: Graphische Darstellung der Krampfschwellen und der dazugehörigen Clonazepam-Plasmakonzentrationen. Die Säulen über den Versuchtstagen stellen die Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt des initialen Klonus dar (in ng/ml, rechte Ordinate), die durch Linien verbundenen Kreise markieren die Krampfschwellenwerte (mg/kg Pentetrazol, linke Ordinate). Die beiden letzten Punkte am Ende jeder Behandlung stellen die Werte der Bestimmungen 24 h und 8 Tage nach dem Absetzen dar. Die Nummern der Tiere stehen in den einzelnen Abbildungen.

Bei Hund Nr. 97 ist die Entwicklung einer Toleranz rein optisch nicht so deutlich zu erkennen, aber wenn man das Verhältnis von Krampfschwelle zu Plasmakonzentration betrachtet (siehe Tab.1), ist der Wert dieses Quotienten am letzten Bestimmungstag niedriger als zu Beginn der Behandlung.

Bei Hund Nr. 98 bleibt die Krampfschwelle zunächst trotz steigender Konzentrationen von Clonazepam konstant, sie sinkt dann aber ab der 3. Behandlungswoche bei gleichbleibenden Konzentrationen (siehe Abb.7 unten).

Der von Löscher (1983) bei täglich wiederholter Infusion von Pentetrazol beschriebene kindling-artige Effekt konnte bei unseren Untersuchungen ausgeschlossen werden, da in Vorversuchen bei zwei Hunden bei wöchentlich durchgeführten Krampfschwellenbestimmungen mit Pentetrazol die bis zum Auftreten des initialen Klonus pro kg Körpergewicht infundierte Pentetrazolmenge über 4 Wochen nahezu konstant blieb.

Halbwertszeiten:

Die Halbwertszeiten von Clonazepam wurden jeweils wöchentlich nach der Injektion der Testdosis von 0,1 mg/kg Clonazepam i.v. bestimmt. Zur Berechnung wurden die Plasmakonzentrationen der nach 30 min, 1, 2 und 3 Stunden entnommenen Blutproben verwendet (siehe Tab.2).

Die ermittelten Halbwertszeiten nach der ersten Clonazepam-Injektion lagen bei allen Hunden außer bei Nr. 68 in dem bei dieser Spezies erwarteten Bereich von 1,3 $\pm$ 0,3 Stunden. Mit zunehmender Behandlungsdauer zeigten sie jedoch bei allen Tieren eine steigende Tendenz (siehe Abb.8).

Plasmakonzentrationen nach 0,1 mg/kg Clonazepam i.v. [ng/ml]

Hund Nr		68			95				96			97					98						102			
Vers. Tag		8.	15	22.	8.	15	22	29	8	15	22	8	15	22	29	36	8	15	22	29	36	43	8	15	22	29
Zeit nach Clona	30 min	62	57	72	29	32	58	71	24	56	82	31	28	58	43	56	36	93	98	66	49	56	30	52	43	52
	1 h	56	50	68	20	25	60	62	24	53	68	21	22	55	40	55	27	90	82	64	46	47	29	41	35	47
	2 h	48	48	64	10	22	56	72	16	49	65	11	12	54	24	48	14	88	76	58	45	49	17	35	29	39
	3 h	39	44	59	9	15	54	71	9	37	64	10	8	39	23	42	10	64	61	50	38	46	10	26	13	23

Tab.2: Plasmakonzentrationen der einzelnen Hunde 30 min, 1, 2 und 3 Stunden nach 0,1 mg/kg Clonazepam i.v. während der oralen Behandlung.

HALBWERTSZEITEN

[h]

Hund Nr. / Beh.-Woche	102	98	97	96	95	68
1.	1,5	1,3	1,5	1,7	1,4	3,8
2.	2,7	4,9	1,4	4,4	2,5	7,5
3.	1,6	4,1	4,7	8,2	19,3	9,2
4.	2,2	5,6	2,5		-[1)]	
5.		7,5	5,8			
6.		12,6				

Abb.8: Halbwertszeiten von Clonazepam während der ersten drei Stunden nach 0,1 mg/kg i.v. bei den wöchentlichen Krampfschwellenbestimmungen.

1) Bei Hund Nr. 95 war nach 4 Behandlungswochen in den ersten drei Stunden nach der Injektion kein Abfall der Clonazepam-Konzentrationen mehr festzustellen.

3.2.2 Ergebnisse der Versuche zum Nachweis der akuten Toleranz

Diese Versuche wurden an 10 Hunden durchgeführt. Bei 5 von diesen Tieren konnte jedoch auch nach einer Erhöhung der initialen Pentetrazoldosis und der Infusionsmenge keine auswertbare Reaktion im EEG induziert werden und bei einem weiteren Tier traten nach der ersten Clonazepam-Injektion keine Spike wave-Komplexe im EEG mehr auf.

Die Versuche konnte also nur bei vier Tieren ausgewertet werden.

3.2.2.1 Beschreibung der Elektroenzephalogramme

3.2.2.1.1 EEG vor der Gabe von Pentetrazol

In Abbildung 9a ist der typische EEG-Verlauf vor der initialen Pentetrazol-Bolusgabe dargestellt.

Im EEG zeigte sich dabei eine vorwiegend unregelmäßige Aktivität mittlerer Amplitude (20-30 µV) mit Frequenzen um 4-6/sec (Theta-Rhythmus). Zusätzlich traten manchmal Unterlagerungen langsamerer Wellen von 2-3/sec sowie raschere Frequenzen aus dem α- und ß-Bereich auf.

3.2.2.1.2 EEG während der Pentetrazol-Bolusgabe

Erste, durch Pentetrazol bedingte Veränderungen im EEG traten ca. 1 Minute nach Beginn der 3 Minuten lang dauernden Pentetrazol-Bolusinjektion auf. Zuerst erfolgte aus der unregelmäßigen, flachen Aktivität ohne stabilen Rhythmus ein Übergang in isolierte Gruppen 5-10 Sekunden dauernder Aktivität mit abrupt hochamplitudigen, vorwiegend rhythmischen, langsamen Wellen sowie steilen Wellen und Komplexen aus

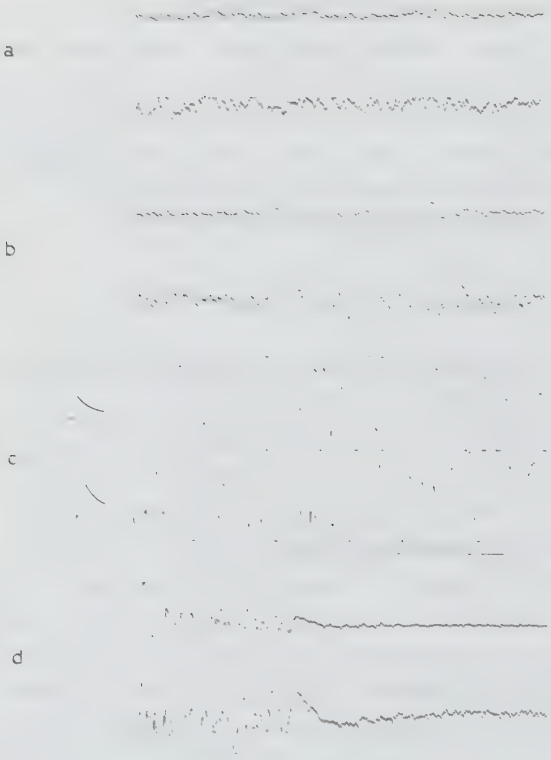


Abb.9: EEG vor und während der Pentetrazol-Bolusgabe (Hund Nr. 97). Dargestellt sind die EEG-Ableitungen K_5 (oben) und K_6 (unten) (siehe Abb.5).

a: EEG vor Beginn der Pentratzol-Bolusgabe
b: EEG ca. eine Minute nach Beginn der Pentetrazol-Injektion
c: Spitzenpotentiale gegen Ende der Pentetrazol-Injektion
d: Beginn des Erschöpfungsstadiums, ca. 20 sec Dauer

Spitzen mit langsamer Nachschwankung, bei der aber auch manchmal einzelne Spitzen nicht zu erkennen waren, sondern nur die Nachschwankungen alleine auftraten (siehe Abb.9b).

Aus dieser Phase entwickelte sich dann sehr schnell die Hauptphase der Krampfaktivität mit rekrutierenden, hochamplitudigen raschen spikes-Serien, die in eine unregelmäßige, paroxysmale Aktivität (2-4/sec) von Spike wave- und Multi spike wave-Komplexen überging (siehe Abb.9c). Die Amplitude dieser Spitzen überschritten dabei teilweise weit eine Spannung von 200 µV.

Bei allen Tieren trat 40-80 Sekunden nach dem Beginn dieser Hauptphase mit den Spitzenpotentialen ein Erschöpfungsstadium auf (post/interictale Depression), das unterschiedlich lange dauerte (bis zu 30 sec). Diese Phase war durch einen abrupten Zusammenbruch der gesamten Aktivität mit Spannungsdepression gekennzeichnet. Dabei waren kaum noch Frequenzen nachweisbar, nur noch sehr flache, unregelmäßige Schwankungen (siehe Abb.9d). Dieses Stadium wurde durch ein erneutes Auftreten von Krampfpotentialen beendet.

Im Verlauf der Krampfaktivität zeigte sich eine Zunahme langsamerer Wellenanteile, und es bildeten sich erneut Spike wave-Komplexe. Dabei war die Frequenz der spikes aber deutlich langsamer als in der Hauptphase, sie lag etwa bei 2/sec.

3.2.2.1.3 EEG vor und während der Clonazepam-Injektionen

Das EEG vor den Clonazepam-Injektionen war von der schon beschriebenen intermittierenden, flachen Grundaktivität beherrscht, wobei der Theta-Rhythmus gehäuft vorkam. Dazwischen befanden sich Einlagerungen paroxysmal auftretender, unregelmäßiger Spike wave-Komplexe, wobei bei einigen Tieren vereinzelt Spitzenpotentiale ohne langsame Nachschwankungen und bei anderen Spitzenpotentiale nur am Anfang der hoch-

amplitudigen Krampfaktivität auftraten und von Nachschwankungen ohne deutlich erkennbare spikes begleitet wurden (siehe Abb.10a). Teilweise waren Bereiche einer langsameren Aktivität im Grundrhythmus zu beobachten (Delta- statt Theta-Wellen).

Nach der Clonazepam-Injektion erfolgte eine deutliche Verringerung des Theta-Anteils durch eine Zunahme langsamer Wellen aus dem Delta-Bereich (2,5-3/sec). Spike wave-Komplexe als Zeichen der Krampfaktivität wurden während der Wirkungsdauer des Medikaments meist unterdrückt und traten nur noch selten auf (siehe Abb.10b). Ein Nachlassen der Clonazepam-Wirkung war an einem Ansteigen der Amplituden und einer Gruppenbildung der Delta-Wellen zu erkennen, die dann wieder in intermittierende Einlagerungen von hochamplitudigen Spitzenpotentialen mit Nachschwankungen bzw. Nachschwankungen allein übergingen, allerdings in weit geringerer Anzahl als vor der Clonazepam-Gabe (siehe Abb.10c).

Bei Hund Nr. 102 gelang es auch nach einer Erhöhung der berechneten Bolus- und Infusionsmenge um 30% (auf 24 mg/kg bzw. 15 mg/kg Pentetrazol pro Stunde) nicht, typische Spike wave-Komplexe im EEG zu erzeugen. Es zeigte sich nur eine atypische Form von Krampfaktivität mit Gruppen von niederamplitudigen Sharp and slow wave-Komplexen, die in höheramplitudige Delta-Wellen übergingen, ohne daß Spitzen sicher abzugrenzen waren. Diese Gruppen waren in die Grundaktivität eingelagert.

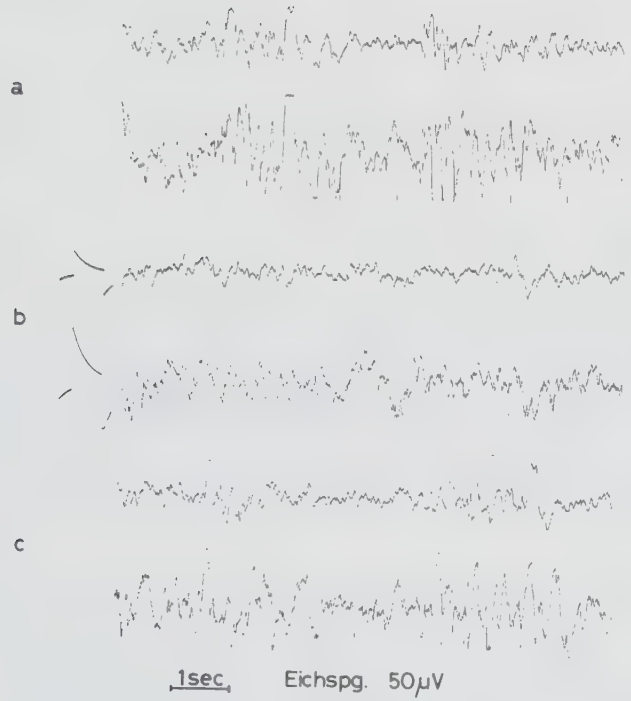


Abb.10: EEG vor und während der 15minütigen Aufzeichnung nach der Clonazepam-Injektion. Dargestellt sind wieder die EEG-Ableitungen K_5 (oben) und K_6 (unten) bei Hund Nr. 103.

a: EEG vor der Clonazepam-Injektion
b: EEG 2 Minuten nach der Injektion
c: EEG 13 Minuten nach der Injektion

3.2.2.2 Herzfrequenz, Blutdruck und Körpertemperatur während der Versuche

Bei allen Tieren war während der Pentetrazol-Bolusinjektion ein Anstieg der Herzfrequenz auf das etwa 3fache des Ausgangswertes zu beobachten, Maximalwerte lagen dabei um 250/min. Innerhalb von 20 min nach Beginn der Pentetrazol-Infusion sank die Frequenz aber wieder auf normale Werte, und ein weiterer Anstieg während der Dauer des Versuches konnte durch 1-2malige Piritramidgaben verhindert werden. Lediglich bei Hund Nr. 97 zeigte sich nach dem Pentetrazol-bedingten Anstieg nur ein geringer Abfall der Herzfrequenz auf Werte um 180/min, der selbst durch mehrmalige Injektionen von Piritramid nur bis 160/min gesenkt werden konnte.

Der Verlauf der Blutdruck-Kurve war bei allen Tieren einheitlich. Während der Pentetrazol-Bolusgabe erfolgte ein Anstieg auf systolische Spitzenwerte von ca. 320 mmHg, danach normalisierte sich der Blutdruck innerhalb von 20 min und blieb während der gesamten Versuchsdauer ziemlich konstant.

Durch eine Anpassung der Raumtemperatur wurde versucht, die Körpertemperatur der Versuchstiere innerhalb der physiologischen Grenzwerte zu halten. Das gelang bei 3 Versuchen, bei Hund Nr. 103 war jedoch trotz einer Erhöhung der Raumtemperatur auf 30°C ein Abfall der Körpertemperatur auf 36,4°C nicht zu verhindern.

3.2.2.3 Darstellung der Ergebnisse

In Tabelle 3 sind die Veränderungen in der Anzahl der Spike wave-Komplexe pro Minute bei allen Versuchen zusammengefaßt. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in den Abbildungen 11-14 graphisch dargestellt.

Hund Nr. 97 (siehe Abb.11):
Bei diesem ersten Versuch wurden 4 x 0,05 mg/kg Clonazepam im Abstand von 50 min verabreicht. Die Beobachtungsdauer des EEG betrug bei diesem Hund nur 10 Minuten. Erst aufgrund der Ergebnisse bei diesem Hund (starke Unterdrückung über längere Zeit) wurde bei den nachfolgenden Versuchen die Clonazepam-Dosis auf 0,03 mg/kg verringert und die Dauer der EEG-Beobachtung nach den einzelnen Injektionen auf 15 Minuten ausgedehnt.

Hunde Nr. 100, 103 und 104 (siehe Abb.12, 13 und 14):
Diesen Tieren wurde 4 mal im Abstand von 50 Minuten 0,03 mg/kg Clonazepam injiziert. Bei Hund Nr. 100 mußte die Pentetrazol-Menge um ein Drittel gesteigert werden (25 mg/kg Bolusdosis und 15 mg/kg/h Infusionsmenge), um ein auswertbares EEG zu erhalten. Trotzdem blieb die Plasmakonzentration bei den Hunden Nr. 100 und Nr. 103 in etwa konstant, nur bei Hund Nr. 104, der die normale Dosis Pentetrazol erhalten hatte, stieg sie während der Dauer des Versuches stark an.

Zeit nach Clona [min]	2	7
Plasmakonz Clona [ng/ml]	31,5	26,6
Plasmakonz PTZ [µg/ml]	25,6	
Körpertemperatur [°C]	38,8	
Herzfrequenz [min⁻¹]	180	

0	2	7
13,7	35,1	32,1
32,0		
39,2		
160		

0	2	7
17,1	39,1	42,6
45,6		
39,1		
165		

0	2	7
17,4	38,5	33,9
41,0		
39,0		
150		

Abb.11: Graphische Darstellung der Ergebnisse bei Hund Nr.97. Die Säulen stellen die Anzahl der Spike wave-Komplexe (s/w) dar. Die alleinstehende Säule ist der arithmetische Mittelwert der Anzahl während des 3minütigen Vorlaufes, nachfolgend ist jeweils die Anzahl pro Minute (1. bis 10.) nach der Injektion von 0,05 mg/kg Clonazepam aufgetragen. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Injektionen betrug 50 Minuten.
Über den Diagrammen ist die Reduktion der Zahl der Spike wave-Komplexe in Prozent angegeben.
Die Tabelle unterhalb des Säulendiagramms zeigt die Plasmakonzentration von Clonazepam und Pentetrazol in Blutproben, die zu bestimmten Zeiten nach der Clonazepam-Injektion ("Zeit nach Clona.") entnommen wurden, sowie die Körpertemperatur und Herzfrequenz des Tieres in den einzelnen Versuchsabschnitten.

Zeit nach Clona [min]	2	10
Plasmakonz. Clona [ng/ml]	32,7	13,8
Plasmakonz. PTZ [µg/ml]	30,5	
Körpertemperatur [°C]	37,8	
Herzfrequenz [min⁻¹]	80	

0	2	10
10,9	27,6	14,9
34,1		
37,8		
78		

0	2	10
12,1	37,7	21,0
35,1		
37,7		
74		

0	2	10
17,2	43,5	24,6
38,3		
37,9		
78		

Abb.12: Graphische Darstellung der Ergebnisse bei Hund Nr. 100. Diesem Hund wurden 4 Einzelinjektionen von je 0,03 mg/kg Clonazepam verabreicht. Die Anzahl der Spike wave-Komplexe wurde jeweils über 15 min verfolgt. Weitere Erklärung siehe Abbildung 11.

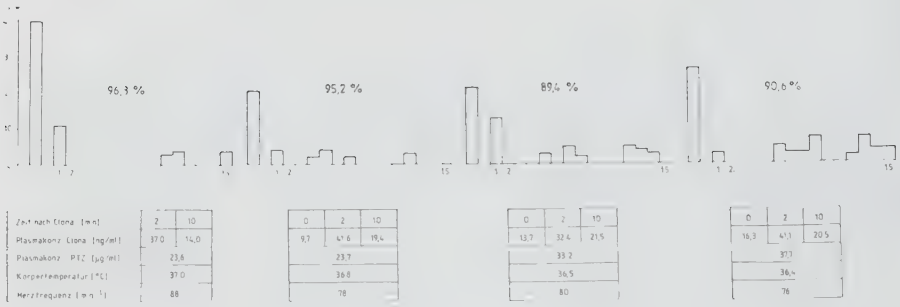
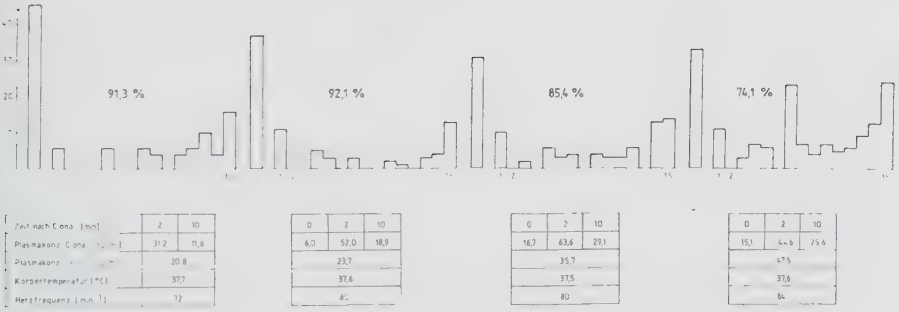


Abb.13: Graphische Darstellung der Ergebnisse bei Hund Nr. 103. Beschreibung siehe Abbildung 11.



Zeit nach Coma [min]	2	10
Plasmakonz. Coma [ ]	31,2	11,6
Plasmakonz. [ ]	20,8	
Körpertemperatur [°C]	37,7	
Herzfrequenz [min⁻¹]	72	

0	2	10
6,0	52,0	18,9
23,7		
37,6		
80		

0	2	10
16,7	63,6	29,1
35,7		
37,5		
80		

0	2	10
15,1	44,6	25,6
47,5		
37,6		
84		

Abb.14: Graphische Darstellung der Ergebnisse bei Hund Nr. 104. Beschreibung siehe Abbildung 11.

Nr. \ min	1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
97	19	33	21	24	5	0	0	0	2	0	0	0	1	1					
	22	27	21	23	7	0	0	0	0	2	0	2	1	5					
	26	24	24	25	6	0	1	1	0	0	1	0	4	3					
	28	34	39	34	7	0	0	0	0	0	0	8	1	5					
100	25	23	35	28	12	2	1	2	1	2	4	0	4	6	7	6	3	8	1
	27	24	24	25	9	7	5	4	4	11	3	9	9	6	3	6	8	6	5
	20	26	31	26	9	5	2	1	6	4	4	4	7	7	4	4	2	2	1
	38	37	44	40	19	4	5	5	1	4	8	1	1	7	10	12	8	11	6
103	46	37	38	40	11	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0	4
	26	17	20	21	4	0	0	2	4	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0
	15	23	28	22	13	0	0	0	3	0	5	2	0	0	0	5	4	3	0
	29	25	27	27	3	0	0	0	0	5	3	3	7	0	0	2	7	4	4
104	52	41	45	46	6	0	0	0	6	0	0	6	4	0	4	6	10	4	14
	41	40	33	38	11	0	0	5	3	0	3	0	0	2	1	0	3	4	13
	24	38	32	31	10	0	2	0	6	3	4	0	4	3	3	6	0	13	14
	29	41	32	34	11	0	3	7	6	5	24	7	4	7	5	6	9	13	25

Tab.3: Anzahl der Spike wave-Kompexe bei den einzelnen Versuchen in den 3 Minuten des Vorlaufes vor jeder Clonazepam-Injektion (1-3 min), arithmetischer Mittelwert dieser Anzahl ($\bar{x}$) und Zahl der Spike wave-Komplexe in den ersten 10 bzw. 15 Minuten (1-10 bzw. 1-15 min) pro Minute nach der Clonazepam-Injektion.

3.2.3 Ergebnisse der Versuche zum Nachweis einer physischen Abhängigkeit

3.2.3.1 Untersuchungen nach dem Absetzen der subakuten Behandlung bei den Versuchen zum Nachweis einer Toleranz (siehe Abschn.3.2.1)

Die Krampfschwellen wurden bei allen Hunden noch einmal 24 h und 8 Tage nach dem Absetzen der Clonazepam-Behandlung bestimmt und mit den vor Beginn der Behandlung ermittelten Ausgangswerten verglichen (siehe Abb.15).

KRAMPFSCHWELLE (mg/kg Pent.)

Hund	Kontrolle	nach Absetzen	
	1. Tag	24h	8 Tage
68	18,2	14,5	20,4
95	16,1	13,2	17,7
96	9,2	3,4	8,9
97	10,8	5,8	11,5
98	11,0	5,7	9,8
102	16,0	9,2	18,0

Abb.15: Krampfschwellen vor Beginn, 24 h und 8 Tage nach dem Absetzen der Clonazepam-Behandlung bei den Versuchen zum Nachweis einer Toleranz (siehe Abschn.3.2.1).

Es zeigte sich, daß die Krampfschwellenwerte 24 h nach dem Absetzen der Behandlung bei den einzelnen Tieren deutlich niedriger waren als die Kontrollwerte vor Beginn der Behandlung. Eine Woche später waren die Ausgangswerte dann wieder erreicht bzw. überschritten.

Als bei dem ersten Hund die orale Behandlung beendet wurde, beobachteten wir bei diesem Tier eine Freßunlust. Daraufhin wurde die Körpertemperatur gemessen und es zeigte sich eine Hyperthermie ohne irgendwelche klinische Anzeichen einer Erkrankung.

Aufgrund dieser Feststellungen wurde dann auch bei den anderen Hunden nach dem Absetzen der Behandlung täglich das Körpergewicht und die Körpertemperatur gemessen. 5 der 6 Tiere zeigten eine Freßunlust, die sich auch in einem Gewichtsverlust äußerte und etwa ein Woche lang anhielt. Danach war das ursprüngliche Gewicht wieder erreicht. Zwei der Tiere, die beiden jüngsten, die beide ca. 1 jahr alt waren, zeigten eine Hyperthermie, die auch etwa ein Woche lang anhielt. Bei den 4 anderen Hunden blieb die Körpertemperatur konstant.

Die genauen Werte bei den einzelnen Tieren sind in Abbildung 16 dargestellt.

Nur ein Hund zeigte nach dem Absetzen keine auffallenden Veränderungen.

Die Möglichkeit, Veränderungen im Allgemeinverhalten der Hunde nach dem Absetzen der Behandlung sicher festzustellen, war bei diesem Versuch in unserem laboratorium nicht gegeben. Diese Beobachtungen wurden dann in einem speziellen Versuch zum nachweis einer physischen Abhängigkeit in den Zentralen Tierversuchslaboratorien der Freien Universität Berlin (ZTL) durchgeführt.

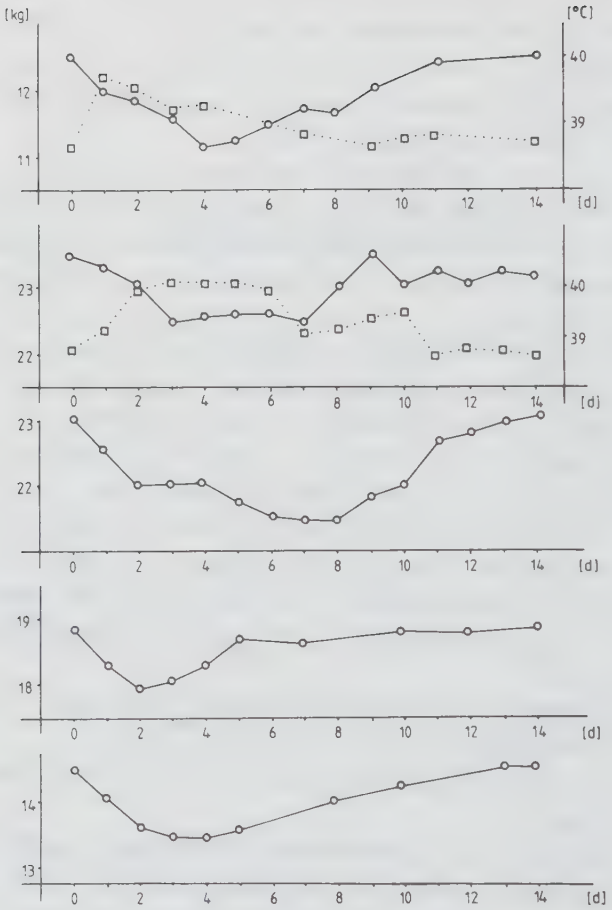


Abb.16: Körpergewichte und Körpertemperaturen der Hunde Nr. 95, 98, 68, 96 und 97 (von oben nach unten) nach dem Absetzen der Behandlung bei dem Versuch zum Nachweis einer Toleranz. Aufgetragen sind die Gewichte (linke Ordinate, markiert durch kleine Kreise) und die Temperaturen (rechte Ordinate, markiert durch kleine Quadrate) in den ersten 14 Tagen nach dem Absetzen.

3.2.3.2 Ergebnisse der ZTL-Versuche

Zwei der 6 Versuchshunde, beides männliche Tiere, zeigten nach den ersten oralen Dosen von Clonazepam eine deutliche Ataxie. Besondere Schwierigkeiten hatten sie beim Untersetzen und der Bewegungskoordination der Hinterhand. Nach 3-4 Tagen Behandlung waren diese Symptome nicht mehr zu beobachten.

Die anderen 4 Tiere zeigten kein verändertes Verhalten nach dem Beginn der Behandlung, und auch das Verhalten der beiden Tiere mit der anfänglichen Ataxie war während der restlichen Behandlungsdauer normal.

3.2.3.2.1 Entzugserscheinungen nach Injektion von Flumazepil

Vor und nach der Injektion von 1,0 mg/kg i.v. des Benzodiazepin-Antagonisten Flumazepil befanden sich die Tiere in ihrem vertrauten Auslauf. Sie liefen dort interessiert umher und zeigten ihr aufmerksames und zutrauliches Normalverhalten. Schon ab einer Woche Behandlungsdauer zeigten sich bei den Tieren nach der Injektion von Flumazepil deutliche Angsterscheinungen. Unmittelbar nach der Injektion des Antagonisten zog sich jedes der Tiere in eine Ecke des Auslaufes zurück, wo es sich in Brust-Brauch-Lage niederkauerte. Durch Ansprache oder Futterangebot konnte keine Veränderung dieses Verhaltens erreicht werden. 60 bis 100 Minuten nach der Gabe des Antagonisten stellte sich dann wieder das Normalverhalten ein.

Weitere Symptome, die bei den in den 6 Wochen nacheinander mit Flumazepil behandelten Tieren auftraten (Tremor der Extremitäten, Erhöhung der Körpertemperatur) sind in Abbildung 17 zusammengefaßt. Als Dauer der Entzugserscheinungen wurde die Zeit von der Injektion des Antagonisten bis zum Wiedereinsetzen des Normalverhaltes bezeichnet.

Die Körpertemperatur der Hunde wurde kurz vor der Injektion, 30 Minuten danach und dann wieder am Ende der Entzugserscheinungen gemessen.

Behandlungsdauer 1 Woche, Hund Nr. 1:
In den ersten 30 Minuten nach der Injektion von Flumazepil zeigte sich bei diesem Tier ein deutlicher Tremor der Vorderextremitäten. Die Körpertemperatur blieb bei dem Hund konstant, die Angsterscheinungen ließen nach 70 min abrupt nach.

Behandlungswoche	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Hund Nr.	1	5	2	6	4	3
Angst	+	+	+	+	+	+
Tremor	++	+++		++		+
Temp.-Erh. (max)		1,4	0,6	0,8	0,8	1,4
Dauer [min]	70	90	70	100	60	60

Abb.17: Entzugserscheinungen und deren Dauer nach 1 mg/kg Flumazepil bei den einzelnen Tieren.

Behandlungsdauer 2 Wochen, Hund Nr. 5:
Bei diesem Hund zeigte sich ein starker Tremor aller Extremitäten, der etwa 45 Minuten lang anhielt. Die Körpertemperatur stieg um 1,4°C auf 39,3°C. Während dieser Zeit war bei dem Tier auch eine verstärkte Salivation festzustellen.

Behandlungsdauer 3 Wochen, Hund Nr. 2:
Außer der Ängstlichkeit von 70 Minuten Dauer und einer Erhöhung der Körpertemperatur um 0,6°C zeigte dieses Tier keine weiteren Entzugserscheinungen.

Behandlungsdauer 4 Wochen, Hund Nr. 6:
Dieses Tier zeigte wieder Tremor der Vorderextremitäten. Die Temperatur stieg um 0,8°C auf 39,4°C nach der Injektion an, beim Ende der Angsterscheinungen 100 Minuten danach lag sie wieder bei 38,9°C.

Behandlungsdauer 5 Wochen, Hund Nr. 4:
Bei diesem Hund war kein Tremor zu beobachten, nur ein Anstieg der Körpertemperatur um 0,8°C 30 Minuten nach der Flumazepil-Injektion, der bis zum Ende der Entzugserscheinungen nach 60 min anhielt.

Behandlungsdauer 6 Wochen, Hund Nr. 3:
Bei diesem Tier zeigte sich wieder ein Tremor aller Extremitäten. Die Temperatur stieg um 1,4°C auf 39,7°C an und lag beim Wiedereinsetzen des Normalverhaltens bei 39,1°C.

Die Plasmakonzentration von Clonazepam der einzelnen Hunde vor und 60 Minuten nach der Injektion des Antagonisten Flumazepil zeigt Abbildung 18.

Um die Wirkung des Injektionsvorganges als auslösenden Faktor für die Angsterscheinungen auszuschließen, wurde einigen der Tiere während der Clonazepam-Behandlung zur selben Tageszeit wie sonst Flumazepil nur Kochsalzlösung

injiziert. Das hatte keine Folgen, die Hunde zeigten danach weiter ihr Normalverhalten. Auch die Körpertemperatur stieg dabei nicht an.

PLASMAKONZ. CLONAZEPAM

[ng/ml]

Hund Nr.	Woche	vor Flumazepil	60 min nach Flumazepil
1	1	75	78
5	2	59	93
2	3	8	81
6	4	75	96
4	5	35	70
3	6	61	89

Abb.18: Clonazepam-Konzentrationen im Plasma vor und 60 Min nach der Injektion von 1 mg/kg Fluamzepil (d.h. 1 h und 2 h nach der morgendlichen Applikation von 0,5 mg/kg Clonazepam p.o.).

3.2.3.2.2 Entzugserscheinungen nach dem Absetzen der oralen Behandlung

Nach einer Dauer von 7 Wochen wurde die Behandlung mit Clonazepam beendet.

Alle Hunde zeigten bereits am Tag nach der letzten oralen Dosis von Clonazepam eine deutliche Mattigkeit und Lustlosigkeit, die sich bei den Tieren in längerer, in Seitenlage verbrachter Zeit während der Dauer der Beobachtung äußerte. Das war sonst sowohl vor als auch während der Clonazepam-Behandlung niemals vorgekommen.

Eine Ängstlichkeit, wie sie bei dem Auslösen von Entzugserscheinungen durch Flumazepil bei allen Hunden zu beobachten war, trat nach dem Absetzen der Behandlung jedoch bei keinem der Tiere auf. Zwei der sechs Hunde, beides weibliche Tiere, nahmen außer der Seitenlage eine Körperstellung ein, die vorher nie bei ihnen beobachtet werden konnte: sie drehten sich aus der Seitenlage auf den Rücken und verharrten in dieser Stellung einige Minuten lang. Nach dem Aufstehen aus dieser Rückenlage schüttelten sich beide Tiere öfters, wie es auch nasse Hunde tun ("wet dog shakes"). Dieses Schütteln zeigte sich auch bei den anderen Tieren während der Entzugsphase in vermehrtem Ausmaß, wenn auch ohne vorhergehende Rückenlage.

Ebenfalls bei allen Hunden trat in den ersten 5 Tagen des Entzuges eine Erhöhung der Körpertemperatur bis zu 1,2°C über den Durchschnitt der beiden vorhergegangenen Wochen auf.

Obwohl die Tiere ihre tägliche Futterration auffraßen und keine Freßunlust zeigten wie die Hunde in den Versuchen zum Nachweis einer Toleranz, nahmen sie dennoch in den ersten Tagen nach dem Absetzen der Clonazepam-Behandlung leicht ab.

Bei Hund Nr. 5 konnte am zweiten Tag des Entzuges ein Krampfanfall beobachtet werden. Der Anfall begann mit Masti-kationsbewegungen und Salivation, gefolgt von klonischen,

teilweise auch tonischen Konvulsionen des ganzen Körpers mit Defäkation. Das Tier lag dabei in Seitenlage, die Konvulsionen gingen in heftige Ruderbewegungen über. Der Anfall endete nach etwa 3 Minuten.

Die Entzugserscheinungen dauerten bei den einzelnen Tieren unterschiedlich lange bis zu 8 Tagen, danach war während der Beobachtung kein Unterschied mehr zu dem Verhalten vor dem Absetzen der Behandlung festzustellen. Lediglich bei einem Hund war das Körpergewicht noch um 0,4 kg erniedrigt.

In Abbildung 19 sind die als Entzugserscheinungen bewerteten Symptome, die bei den Hunden auftraten, einzeln aufgeführt. In Abbildung 20 sind die dafür nach Abbildung 6 berechneten Punktzahlen pro Tier und Tag graphisch dargestellt, Abbildung 21 zeigt die durchschnittliche Punktzahl aller Tiere pro Entzugstag.

Abbildung 22 zeigt die Durchschnittswerte der Plasmakonzentrationen von Clonazepam, die bei den Hunden mindestens einmal wöchentlich unmittelbar vor und 90 min nach der morgendlichen oralen Dosis in Blutproben bestimmt wurden.

Bei den ebenfalls in der Abbildung angegebenen Halbwertszeiten handelt es sich um grobe Schätzungen, wobei die 90 min nach Eingabe bestimmte Konzentration als maximaler Wert behandelt und angenommen wurde, daß sie bis zur nächsten Dosierung linear auf den Minimalwert (12 h) abfallen würde.

	1. Tag						2. Tag						3. Tag						4. Tag					
Hund Nr	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Unphysiol. Verhalten: Rückenlage							+++	+++					+++	++					++	++				
Unphysiol. Verhalten: Mattigkeit	+++	+++	++	++	++	+	+++	+++	++	++	+++		++	++	++	++	+++	+	++	++		+	+++	+
Unphysiol. Verhalten: wet dog shakes							+++	++	++	+	++		+++	+	++	+	++		++	+	+	+	+	
Tremor	+				+++			++	+++		+++	+	+++	+++	++		+++	++		++				
Ton. klon. Anfall											+													
Temperaturerh.	0,3	0,3	0,6	0,4	0,2	0,7	0,8	0,3	0,7	0,3	0,9	1,2	0,5	0,3	1,0	0,6	1,0	0,9		0,2	0,6	0,5	0,9	0,4
Gewichtsverlust	0,4	0,3	0,7	0,5	0,5	0,6	0,9	0,7	1,6	1,0	1,1	1,6	1,2	1,0	1,8	1,1	1,4	1,1	0,7	0,6	1,3	1,1	0,9	0,8
Punktzahl	8	7	9	7	8	9	19	14	17	8	39	16	18	13	20	11	21	14	7	10	10	9	15	7

	5. Tag						6. Tag						7. Tag						8. Tag					
Hund Nr.	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Unphysiol. Verhalten: Rückenlage																								
Unphysiol. Verhalten: Mattigkeit	++	+	+		++		+	+		+	+						+							
Unphysiol. Verhalten: wet dog shakes	+																							
Tremor																								
Ton. klon. Anfall																								
Temperaturerh.			0,1		0,5	0,1	0,1																	
Gewichtsverlust	0,6	0,4	1,3	0,4	0,5	1,1	0,7	0,5	1,6	1,0	0,5	1,2	0,3		1,0	0,9	0,3	0,5	0,1	0,1	0,4			0,1
Punktzahl	4	2	5	1	8	3	3	2	3	3	2	2	1	-	2	2	2	1	-	-	1	-	-	-

Abb.19: Entzugserscheinungen, die bei den einzelnen Tieren an den Tagen nach dem Absetzen der oralen Behandlung auftraten.
Die Temperaturerhöhung ist in °C über dem Durchschnitt der letzten beiden Behandlungwochen angegeben, der Gewichtsverlust in kg unter dem Gewicht des letzten Behandlungstages. Die Anzahl der Punkte wurde nach Abbildung 6 berechnet.

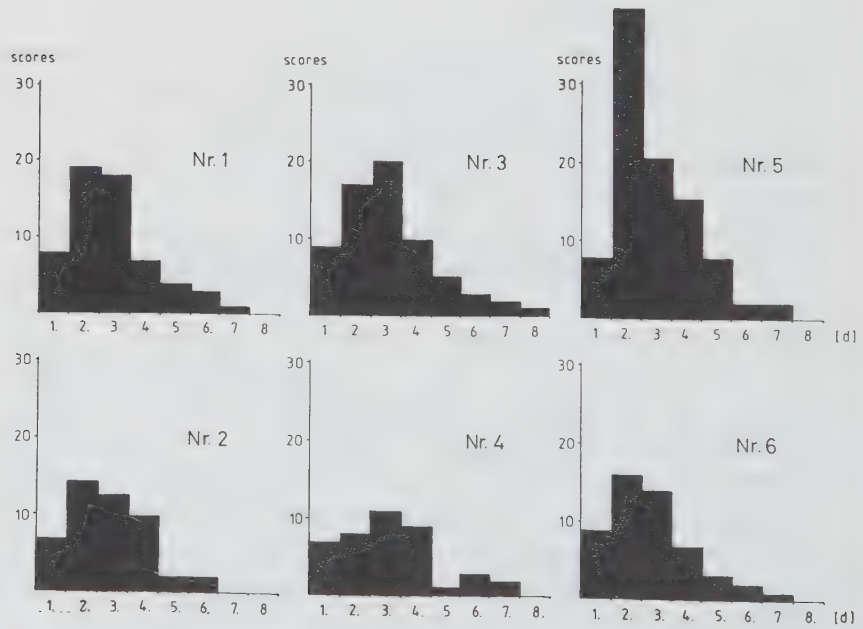


Abb.20: Graphische Darstellung der Entzugs-Punkte der 7 Wochen mit Clonazepam behandelten Hunde. Die Anzahl ist pro Tag nach dem Absetzen der Behandlung aufgetragen. Die Nummern der einzelnen Tiere stehen über den Säulendiagrammen.

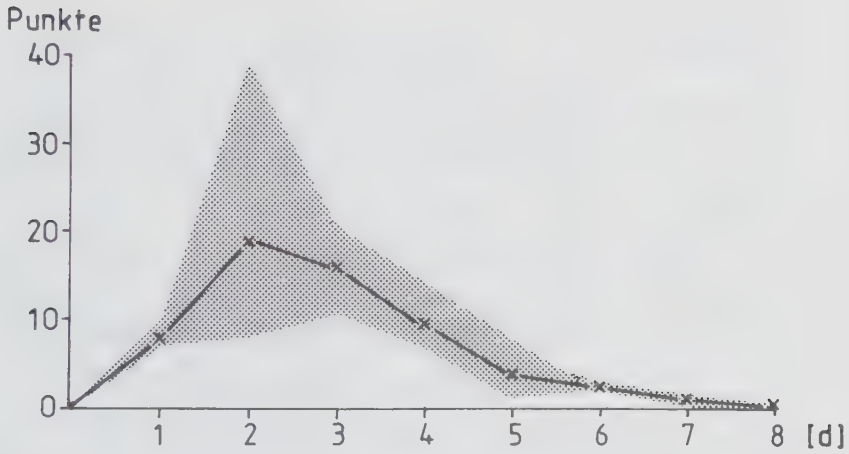


Abb.21: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Punktzahl ($\bar{x}$) der 6 Hunde pro Entzugstag. Die punktierte Fläche zeigt den Bereich von Minimal- zu Maximalwert.

PLASMAKONZ. CLONAZEPAM
[ng/ml]

Hund Nr.	12 h nach 0,5 mg/kg p.o.	1,5 h nach 0,5 mg/kg p.o.	$T_{0,5}$ [h]
1	11 (2-23)	70 (35-128)	3,9
2	7 (3-15)	57 (36-88)	3,5
3	19 (9-34)	72 (29-157)	5,5
4	13 (8-20)	90 (30-205)	3,8
5	30 (12-42)	82 (62-107)	7,2
6	22 (7-35)	77 (41-159)	5,8

Abb.22: Plasmakonzentrationen vom Clonazepam unmittelbar vor und 90 min nach der morgendlichen Dosis (d.h. 12 h und 1,5 h nach 0,5 mg/kg Clonazepam p.o.) während der Behandlung. Es wurde das geometrische Mittel aus allen Proben berechnet, die Werte in Klammern geben den Bereich der Extremwerte an.

4. DISKUSSION

4.1 Entwicklung von Toleranz

Subakute Behandlung:

Bei allen mit Clonazepam behandelten Hunden war nach 3 bis spätestens nach 6 Wochen Behandlungsdauer entweder eine Abnahme der Krampfschwelle bei gleichbleibenden Plasmakonzentrationen von Clonazepam oder eine etwa konstante Krampfschwelle bei steigenden Clonazepam-Konzentrationen festzustellen. Das bedeutet, die antikonvulsive Wirkung von Clonazepam ließ mit mit zunehmender Behandlungsdauer nach oder, mit anderen Worten, es bildete sich eine Toleranz gegenüber Clonazepam. Bei einem Hund, Nr. 102, war die Krampfschwelle nach 3 Wochen Behandlung sogar auf den Ausgangswert gefallen, d.h. die entstandene Toleranz führte zu einem totalen Wirkungsverlust. Bei vorhergegangenen, entsprechenden Vesuchen mit Diazepam (Frey et al., 1984) war das schon nach einwöchiger Behandlung bei 3 von 7 Hunden der Fall. Die Toleranz gegen die antikonvulsive Wirkung entwickelte sich also bei Clonazepam langsamer und ist weniger stark ausgeprägt als bei Diazepam.

Eine gesteigerte metabolische Inaktivierung, die ja auch die Ursache einer Toleranz sein könnte, wurde durch die ebenfalls wöchentlich nach den Krampfschwellenbestimmungen berechnete Halbwertszeit für Clonazepam ausgeschlossen. Bei keinem der Hunde war eine Steigerung der Eliminationsgeschwindigkeit zu beobachten, sondern die Halbwertszeiten zeigten eine steigende Tendenz. Diese schon von Al-Tahan et al. (1984) beschriebene und durch eine Art Sättigungskinetik erklärte Hemmung der Elimination bei Plasmakonzentrationen über 50 ng/ml macht es möglich, beim Hund therapeutisch wirksame Konzentrationen über längere Zeit aufrechtzuerhalten.

Die in unseren Versuchen experimentell erzeugte Toleranz kann also nur funktionelle Ursachen haben.

Eine Erklärung für die im Vergleich mit Diazepam bei Clonazepam langsamere Entstehung einer Toleranz kann gegenwärtig noch nicht gegeben werden. Ein Unterschied besteht darin, daß Clonazepam zu inaktiven Produkten verstoffwechselt wird, während Diazepam, besonders beim Hund, sehr schnell zu schwächer antikonvulsiv wirkenden Benzodiazepinen metabolisiert wird (Löscher und Frey, 1981; Frey und Löscher, 1982). N-Desmethyldiazepam, einer der Hauptmetaboliten, hat eine hohe Affinität zum Benzodiazepin-Rezeptor und kann Diazepam kompetitiv vom Rezeptor verdrängen. Barnett und Fiore (1971) sahen in dieser Verdrängung von Diazepam durch den kumulierenden Metaboliten die Ursache für die Entstehung einer Toleranz. Diese Hypothese konnte jedoch in den Versuchen, die Frey et al. (1984) zur Toleranzentwicklung bei Diazepam durchführten, nicht bestätigt werden.

Weiterhin könnten Unterschiede in der Affinität oder der intrinsischen Aktivität der verschiedenen Benzodiazepine eine Erklärung bieten. Eine endgültige Klärung dieser Fragen ist jedoch nur durch biochemische Untersuchungen der Wechselwirkungen von Arzneimittel und Rezeptor zu erreichen.

Dies stieß beim Hund auf kaum überwindliche technische Schwierigkeiten und ethische Bedenken, die biochemischen Ursachen der Toleranz sollen aber am kleinen Versuchstier geklärt werden.

Hohe Dosen von Flurazepam und Clonazepam, die Ratten über mehrere Wochen verabreicht wurden, hatten eine kurzdauernde Reduzierung der maximalen Bindungskapazität für Benzodiazepine zur Folge (Chiu und Rosenberg, 1978; Rosenberg und Chiu, 1981; Crawley et al., 1982). Möhler et al. (1978) dagegen, die niedrigere Dosen von Diazepam verwendeten, konnten keine nachfolgende Abnahme der Bindungsstellen nachweisen. Sher (1983) zeigte eine dosisäbhängige Reduktion der Benzodiazepin-Rezeptor-Bindung in Kulturen des Cortex cere-

bralis von Mäusefeten, wenn diese 10 Tage lang Diazepam ausgesetzt wurden.

In einer neueren Untersuchung zeigen Gallagher et al. (1984), daß nach einer Diazepam-Behandlung von mindestens drei Wochen Dauer die postsynaptische Empfindlichkeit gegenüber GABA abnimmt. Es waren dabei aber keine meßbaren Veränderungen in der Zahl der Benzodiazepin-Rezeptoren oder der Affinität zum Rezeptor festzustellen. Längere Verabreichung von Diazepam führt also nach diesen Ergebnissen zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber GABA im makromolekularen Benzodiazepin-GABA-Rezeptor-Komplex und damit zu einer schwächeren allosterischen Reaktion des gesamten Rezeptor-Komplexes bei der Anlagerung von Benzodiazepinen.

Solche zentralen Adaptationsvorgänge auf der Ebene des Benzodiazepin-Rezeptors müssen auch die Erklärung für die bei unseren Versuchen mit Clonazepam entstandene Toleranz bieten.

Akute Behandlung:

Bei diesen Versuchen wurde in den Tieren experimentell ein Status epilepticus erzeugt und aufrechterhalten. Dabei wurden dann die Einflüsse von wiederholten Clonazepam-Gaben auf die elektrophysiologischen Veränderungen im EEG untersucht.

Bei den 4 Hunden, bei denen dies gelang, konnte kein eindeutiger Hinweis auf das Auftreten einer akuten Toleranz gefunden werden. Hund Nr. 4, bei dem ein Abfall der Spike wave-Unterdrückung während der beiden letzten Clonazepam-Injektionen festzustellen war, hatte dabei auch den stärkstn Anstieg des Pentetrazol-Plasmaspiegels. Allerdings lag die Anzahl der Spike wave-Komplexe im Vorlauf noch nicht höher als bei den vorhergehenden Injektionen.

Frey et al. (1984) konnten mit demselben experimentellen Modell bei 2 von 6 Hunden eine akute Toleranz gegenüber Diazepam nachweisen. Die Versuche mit Clonazepam erwiesen sich schwieriger als die mit Diazepam. Durch die stärkere

und länger anhaltende Wirkung von Clonazepam konnten mehrere Versuche nicht ausgewertet werden, da nach der ersten Injektion von Clonazepam auch nach längerer Zeit im EEG keine Spike wave-Aktivität mehr zu beobachten war.

Eine ähnliche, fast vollständige Unterdrückung der Krampfaktivität im EEG fanden Frey et al. (1984) bei entsprechenden Versuchen mit N-Desmethyldiazepam. Bei den 3 behandelten Hunden konnten dabei keine Anzeichen einer akuten Toleranz gefunden werden.

Da eine akute Toleranz nur bei der Behandlung des Status epilepticus mit Diazepam beschrieben wurde (Parsonage und Norris, 1967) und auch im Versuch nur bei Diazepam, das im Organismus zu weniger aktiven Metaboliten abgebaut wird, nachgewiesen werden konnte, könnte die Barnett-Fiore'sche Metabolitentheorie eine Erklärung für diese Toleranz bieten. Durch einen Vergleich der Plasmakonzentrationen von Diazepam und N-Desmethyldiazepam bei Hunden mit und ohne akute Toleranz konnte diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen werden (Frey et al., 1984; Philippin, 1984).

Das Auftreten einer akuten Toleranz kann also ebenfalls nur durch zentrale Adaptionsvorgänge auf Rezeptorebene erklärt werden.

Auch wenn das Phänomen der akuten Toleranz bei der klinischen Behandlung des Status epilepticus nur sehr selten auftritt (Parsonage und Norris, 1967), scheint doch aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche die Verwendung von Clonazepam sicherer.

4.2 Entstehen von physischer Abhängigkeit

Als die orale Behandlung bei den Versuchen zum Nachweis einer subakuten Toleranz bei den ersten Tieren beendet wurde, beobachteten wir bei diesen Hunden Symptome, die als

Zeichen einer physischen Abhängigkeit interpretiert werden konnten.

Bei allen sechs Tieren war die Krampfschwelle für intravenös infundiertes Pentetrazol 24 h nach der letzten oralen Dosis deutlich niedriger als der vor Beginn der Behandlung bestimmte Kontrollwert. Eine Woche später waren die Ausgangswerte dann wieder erreicht. Eine ähnliche Übererregbarkeit wurde nach Behandlung mit Pentobarbital und Phenobarbital bei Katzen bzw. Mäusen beschrieben (Jaffe und Sharpless, 1965; Kilian und Frey, 1973). Weitere Hinweise auf eine physische Abhängigkeit waren Anorexie mit Gewichtsverlust bei 5 von 6 Hunden und eine deutliche Hyperthermie bei zwei jüngeren Tieren. Diese Erhöhung der Körpertemperatur konnte nicht durch eine Infektion erklärt werden, da beide Hunde lebhaft waren und auch Interesse an ihrer Umgebung zeigten. Eine klinische Untersuchung erbrachte keine Anzeichen einer Erkrankung.

Da diese Tiere in ihrem Alter, Körpergewicht und Verhalten sehr untrschiedlich waren, sollte die Entwicklung von physischer Abhängigkeit an einer vergleichbaren Gruppe von Hunden unter konstanten Umweltbedingungen untersucht werden. Diese Möglichkeit hatten wir in den Zentralen Tierversuchslaboratorien Berlin, wo auch Verhaltensänderungen bei den Tieren genau beobachtet werden konnten.

Nach einer Eingewöhnungsperiode von 8 Wochen wurden die 6 FBI-Hunde 7 Wochen lang mit Clonazepam behandelt. Die Dosis wurde so gewählt, daß bei den Tieren Plasmakonzentrationen erreicht und aufrechterhalten werden konntn, wie sie vom Menschen her als therapeutisch bekannt sind (Al-Tahan et al., 1984; Eadie, 1984).

Entzugserscheinungen nach Injektion von Flumazepil:

Durch die Entdeckung von spezifischen Benzodiazepin-Antagonisten hatten wir die Möglichkeit, während der Behandlung mit Clonazepam Entzugserscheinungen auszulösen. Dazu wurde der zuerst von Hunkeler et al. (1981) beschriebene Antagonist Flumazepil (Ro 15-1788) in einer Dosierung von 1 mg/kg intravenös verabreicht.

Da in den Veröffentlichungen, in denen solche Versuche an Tieren beschrieben wurden, keine Angaben über eine Dosierung bei intravenöser Applikation zu finden waren, bestimmten wir in Vorversuchen an zwei Hunden die niedrigste Dosis, die notwendig war, um 0,5 mg/kg Clonazepam i.v. beim Hund verläßlich zu antagonisieren. Die geringe Dosis von 1 mg/kg wählten wir, um die agonistische Wirkung, die bei hohen Dosen von Flumazepil beschrieben wird (Vellucci und Webster, 1983), auszuschließen. Auch Nebenwirkungen des Lösungsmittels Glykofurol, das zum Herstellen einer injektionsfähigen Lösung von Flumazepil notwendig war, wurden so vermieden. In den Vorversuchen stellten wir fest, daß eine dem Körpergewicht entsprechende Menge der Glycofurol/Wasser-Lösung sowohl ohne als auch mit Flumazepil keinen Einfluß auf das Verhalten, die Körpertemperatur, Puls, Atmung und Herzfrequenz der behandelten Tiere hatte.

Die kurze Wirkungsdauer von Flumazepil in der niedrigen Dosierung hatte auch den Vorteil, daß die Tiere die gesamte Zeit bis zum Ende der ausgelösten Entzugserscheinungen beobachtet werden konnten.

Durch die Injektion von Flumazepil konnten bei allen Clonazepam-behandelten Hunden, die sonst sehr zutraulich waren und stets die Nähe ihnen bekannter Personen suchten, deutliche Angsterscheinungen ausgelöst werden. Tremor konnte bei 4 Tieren beobachtet werden, 5 zeigten während der Wirkungsdauer des Antagonisten eine Hyperthermie.

Obwohl die durch Flumazepil ausgelösten Entzugserschei-

nungen nach einer Woche Behandlung mit Clonazepam relativ mild waren (keine Temperaturerhöhung, mittlerer Tremor, Gesamtzahl der Entzugspunkte: 5), konnte keine graduelle Entwicklung der Abhängigkeit mit zunehmender Behandlungsdauer nachgewiesen werden. Die Punktzahlen nach 2-6 Wochen Behandlung lagen bei den einzelnen Hunden zwischen 9 und 20, ohne daß ein Zusammenhang mit der Dauer der Behandlung zu erkennen war.

Das könnte eine Folge individueller Unterschiede der einzelnen Tiere sein, der einheitliche Verlauf der Entzugserscheinungen nach dem Absetzen der oralen Behandlung spricht jedoch eher dagegen.

Entzugserscheinungen nach Absetzen der Clonazepam-Behandlung:

Die Symptome, die nach dem Absetzen der oralen Behandlung mit Clonazepam auftraten, waren bei allen Tieren stärker ausgeprägt als nach den Injektionen von Flumazepil. Schon am ersten Tag nach der letzten oralen Dosis zeigten alle Hunde Veränderungen in ihrem Verhalten.

Die Tiere verbrachten einen großen Teil der Beobachtungszeit in Seitenlage, ohne Interesse an ihrer Umgebung zu zeigen. Diese Mattigkeit dauerte bis zum 6. Entzugstag an.

Die Rückenlage, die bei zwei Hunden zu beobachten war, ist ein für Hunde sehr ungewöhnliches Symptom. Es könnte sich dabei um ein Anzeichen von Schmerzen im Abdominalbereich handeln.

Erschöpfungszustände (Kemper et al., 1980) und das Einnehmen von unphysiologischen Körperhaltungen (Lukas und Griffiths, 1984) als Entzugserscheinungen nach Benzodiazepin-Behandlung wurden beschreiben. Als eine solche unphysiologische Körperstellung betrachten letztere bei Affen auch ein lethargisches, apathisches Kauern am Boden, die dabei auf normale Stimuli nicht mehr ansprachen. Die bei den

Hunden auftretende Mattigkeit und Rückenlage können also auch als Entzugserscheinungen bewertet werden.

Die sogenannten "wet dog shakes" werden zwar bei Ratten oft als Entzugssymptom beschrieben, wurden aber trotz ihres Namens beim Hund als solche noch nicht beobachtet. Das deutlich gehäufte Auftreten dieser "shakes" in den ersten Tagen des Entzuges macht es aber wahrscheinlich, daß sie auch beim Hund als Zeichen eines körperlichen Unwohlseins und damit als Entzugserscheinungen betrachtet werden können.

Vom 1. bis zum 4. Tag nach dem Absetzen war bei 5 von 6 Hunden Tremor der Extremitäten zu beobachten. Hyperthermie und Gewichtsverlust trat bei allen sechs Tieren auf. Da alle Hunde ihre tägliche Futterration auffraßen, also keine Freßunlust zeigten wie die Tiere in den Versuchen zum Nachweis einer Toleranz nach dem Ende der Behandlung, muß die Erklärung für den Gewichtsverlust in einer Steigerung des Stoffwechsels gesucht werden.

Das Auftreten der Symptome Tremor, Hyperthermie und Gewichtsverlust wurde schon von Himmelsbach (1939) als Beweis für eine physische Abhängigkeit betrachtet.

Das deutlichste und wohl auch wichtigste Merkmal einer physischen Abhängigkeit von Clonazepam war der am 2. Entzugstag bei Hund Nr. 5 beobachtete Entzugskrampfanfall. Dieser "epileptische" Anfall bei einem sonst klinisch gesunden Hund zeigt die Gefahr einer abrupten Beendigung einer chronischen Clonazepam-Behandlung auch mit therapeutischen Dosen. Auffällig dabei ist, daß gerade dieser Hund zwar nicht die höchsten Plasmakonzentrationen von Clonazepam hatte, aber die längste durchschnittliche Halbwertszeit und damit auch 12 h nach der oralen Dosis noch über der als therapeutisch angesehenen Mindestkonzentration lag. Hund Nr. 2 und Nr. 4 hatten mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 3,5 bzw 3,8 Stunden den schnellsten Abfall der Plasmakonzentration und auch beide die geringsten Entzugssymptome, obwohl Hund Nr. 4 die höchsten Anfangskonzentra-

tionen von Clonazepam zeigte.

Aus den Abbildungen 20 und 21 kann man ersehen, daß die stärksten Entzugserscheinungen zwischen dem 2. und 4. Tag nach dem Absetzen der Behandlung auftraten und dann bis zum 8. Tag langsam nachließen. Eine Woche nach dem Absetzen zeigten alle Tiere wieder ihr Normalverhalten.

Damit ähnelt der zeitliche Verlauf der Entzugssymptome z.B. dem bei einer Morphin-Abhängigkeit, wie er von Kolb und Himmelsbach (1938) beschrieben wurde.

Die geringe Benzodiazepin-ähnliche Eigenwirkung, die dem Antagonisten Flumazepil zugeschrieben wird (siehe Abschn. 2.1.4), könnte eine Erklärung für den Unterschied im Entzugssyndrom nach der Injektion des Antagonisten und nach dem Absetzen der Behandlung bieten. Auch McNicholas et al. (1982) fanden bei Diazepam-abhängigen Ratten nach Injektion von Flumazepil zwar ähnliche, aber nicht identische Entzugserscheinungen wie nach dem Absetzen der Behandlung.

Ein Symptom, das nach der Injektion von Flumazepil bei allen Tieren auftrat, konnte nach dem Absetzen der oralen Behandlung nicht beobachtet werden: Ängstlichkeit. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Symptom eine Eigenwirkung von Flumazepil ist. File et al. (1982) beschreiben eine anxiogene Wirkung von Flumazepil, allerdings erst bei einer weit höheren Dosis als wir sie verwendeten. Auch bei den Vorversuchen, bei denen 2 Hunden Flumazepil verabreicht wurde, traten keine Anzeichen von Angst auf. Es ist allerdings auch möglich, daß die dabei verwendeten Hunde aus unserem Institut eine größere psychische Stabilität besaßen als die unter SPF-Bedingungen aufgezogenen FBI-Hunde.

Damit ist im tierexperimentellen Modell die Möglichkeit einer physischen Abhängigkeit bei den Benzodiazepinen Flurazepam (Rosenberg und Chiu, 1982), Chlordiazepoxid (Ryan und

Boisse, 1983), Diazepam und Lorazepam (McNicholas et al., 1983; Lukas und Griffiths, 1984) und jetzt auch Clonazepam nachgewiesen.

Marks (1980) vertrat noch die Ansicht, Benzodiazepine würden im allgemeinen von Ärzten eher zurückhaltend als zu häufig eingesetzt und der Verbrauch sei im Vergleich mit der Häufigkeit von seelischen Störungen in unserer Gesellschaft nicht zu hoch. Es könne jedoch wie bei allen psychoaktiven Substanzen sowohl eine psychische wie physische Abhängigkeit auftreten, aber nur von geringem Schweregrad. Die Inzidenz einer Abhängigkeit wurde von ihm nach quantitativen Erhebungen als sehr niedrig empfunden. Auch Carranza (1980) ist nach dem Studium der wissenschaftlichen Veröffentlichungen der Meinung, daß nur wenige Fälle einer Benzodiazepin-Abhängigkeit nachweisbar sind.

Kemper et al. (1980) dagegen schreiben, daß allein in der Universitätsklinik Göttingen in den Jahren 1977-1980 (Jahresmitte) erheblich mehr Patienten wegen einer Benzodiazepin-Abhängigkeit aufgenommen werden mußten, als Marks (1978) in den Jahren 1961-1978 in der ganzen Bundesrepublik gefunden hatte. Sie nehmen an, das Suchtpotential der Benzodiazepine sei größer als bisher angenommen. Das schwere Entzugssyndrom, das wir bei unseren Hunden nach dem Ende der Behandlung beobachten konnten, bestätigt diese Ansicht. Daß die Hunde mit Dosen behandelt wurden, wie sie zur Aufrechterhaltung von Plasmakonzentrationen notwendig waren, die bei der Behandlung von epileptischen Patienten als therapeutisch betrachtet werden (Eadie, 1984), macht die Gefahr einer Abhängigkeit noch deutlicher.

Die Möglichkeit einer Abhängigkeit ist also bei länger dauernder Behandlung mit Clonazepam auch in therapeutischer Dosierung immer vorhanden, man sollte eine solche Behandlung mit angemessener Vorsicht durchführen.

Ein schrittweises Absetzen der Behandlung zur Vermeidung von Entzugserscheinungen ist nach unseren Ergebnissen nicht

nur nach einer mißbräuchlichen Anwendung von Benzodiazepinen notwendig (z.B. Harrison et al., 1984), sondern auch nach einer therapeutischen antiepileptischen Behandlung mit Clonazepam.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zum Nachweis einer Toleranz wurden 6 Hunden 3-6 Wochen lang täglich zwei Mal mit 0,5 mg/kg Clonazepam behandelt. Die Krampfschelle für i.v. infundiertes Pentetrazol wurde vor Beginn der Behandlung und dann in wöchentlichen Abständen 15 min nach der i.v. Injektion von 0,1 mg/kg Clonazepam bestimmt. Nach diesen Injektionen wurde jeweils der Abfall der Plasmakonzentration verfolgt und daraus die Halbwertszeit berechnet. Nach der ersten Clonazepam-Injektion stieg bei allen Tieren die Krampfschwelle stark an, sank dann aber trotz gleicher oder sogar höherer Plasmakonzentrationen von Clonazepam. Nach 2-3 Wochen Behandlungsdauer war eine Toleranz klar ersichtlich. Da die Halbwertszeit von Clonazepam bei allen Hunden anstieg, muß die entstandene Toleranz funktionelle Ursachen haben.

Versuche zum Nachweis einer akuten Toleranz wurden unter Neuroleptanalgesie an vollständig relaxierten Hunden durchgeführt, bei denen eine konstante Spike wave-Aktivität im EEG durch Infusion von Pentetrazol aufrechterhalten wurde. Vier Hunden wurden jeweils 4 i.v. Injektionen von Clonazepam im Abstand von 50 min verabreicht (im ersten Versuch 0,5 mg/kg, 0,03 mg/kg bei den weiteren). Bei keinem der Tiere war eine akute Toleranz gegenüber dem Effekt von Clonazepam auf die Spike wave-Aktivität im EEG festzustellen.

Nach dem Absetzen der Behandlung mit Clonazepam waren bei diesen Hunden Symptome zu beobachten, die auf eine physische Abhängigkeit hindeuteten. Alle Tiere hatten 24 h nach dem Ende der Behandlung eine gegenüber dem Kontrollwert auffällig erniedrigte Krampfschwelle. Eine Woche danach waren diese Ausgangswerte dann in allen Fällen wieder erreicht. Fünf der 6 Hunde zeigten Anorexie mit Gewichtsverlust und zwei junge Tiere Hyperthermie. Diese Hinweise auf das Entstehen eine physischen Abhängigkeit wurden in einem zweiten

Versuch an einer vergleichbaren Gruppe von 6 Hunden, die unter konstanten Umweltbedingungen gehalten wurden, genauer untersucht.

Diese Tiere wurden 7 Wochen lang ebenfalls mit 2x0,5 mg/kg/d Clonazepam behandelt. Schon nach einer Woche Behandlungsdauer konnten durch eine i.v. Injektion von 1 mg/kg Flumazepil (Ro 15-1788) leichte Entzugserscheinungen ausgelöst werden.

Nach dem Absetzen der oralen Behandlung waren als Entzugserscheinungen unphysiologisches Verhalten (Mattigkeit, Rückenlage, "wet dog shakes"), Tremor, Hyperthermie, Gewichtsverlust und in einem Fall ein klonisch-tonischer Krampfanfall zu beobachten. Diese Symptome waren am 2. und 3. Tag nach dem Ende der Behandlung am stärksten ausgeprägt und gingen bis zum 8. Tag vollständig zurück.

SUMMARY

Dogs were treated orally with clonazepam 0.5 mg/kg b.i.d. for periods of 3-6 weeks. The convulsant threshold for pentetrazole was determined by iv. infusion before and at weekly intervals 15 min after iv. injection of 0.1 mg/kg clonazepam. The decline of clonazepam plasma concentrations after these injections was followed in order to get an estimate of the eliminition rate.

There was a highly significant increase in the convulsant threshold after the first injection of clonazepam, but the threshold then declined in spite of unaltered or even rising plasma concentrations of the drug. Tolerance was clearly evident after 2-3 weeks. Since the eliminition rate rather tended to decrease with the duration of treatment, the tolerance must be considered as functional.

Experiments to show an acute tolerance were performed in dogs anesthetized and completely relaxed, in which spike wave-activity in the EEG was maintained by an infusion of pentetrazole. In 4 experiments 4 iv. injections of clonazepam (0.05 mg/kg to the first and 0.03 mg/kg to the following dogs) were given at intervals of 50 min. None of these dogs showed an acute tolerance to the effect of clonazepam on the spike wave-acitivity in the EEG.

The dogs, which were treated 3-6 weeks with clonazepam in order to show tolerance, had 24 h after the last dose of clonazepam a convulsant threshold for pentetrazole which was clearly below the control value. This value, however, was reached again one week later. For 1-2 weeks after cessation of clonazepam administration, dogs showed anorexia, loss of weight, and, young dogs at least, hyperthermia. These symptoms were interpreted as signs of physical dependence on clonazepam and led to the second part of our study.

Six dogs were, under constant environmental conditions, treated for 7 weeks with clonazepam, 0.5 mg/kg b.i.d. orally. Already after 1 week of treatment, slight symptoms of withdrawal could be elicited by iv. injection of flumazepil (Ro 15-1788). When clonazepam was finally withdrawn, a self-limiting abstinence syndrome was observed in all dogs, consisting of behavioral alterations (listlessness, wet dog shakes, dorsal recumbency), tremor, a severe clonic-tonic seizure in 1 case, hyperthermia and weight loss. The syndrome was most pronounced on days 2 and 3 after withdrawal, after 1 week all signs of physical dependence had disappeared.

6. LITERATURÜBERSICHT

Al-Tahan, F.; Löscher, W.; Frey, H.-H.: Pharmacokinetics of clonazepam in the dog.
Arch.Int.Pharmacodyn. 268, 180-193 (1984)

Barnett, A.; Fiore, J.W.: Acute tolerance to diazepam in cats and its possible relationship to diazepam metabolism.
European J.Pharmacol. 13, 239-243 (1971)

Barnett, A.; Fiore, J.W.: Acute tolerance to diazepam in cats.
In: Garattini, S.; Mussini, E.; Randall, L.O. (Eds.): The Benzodiazepines, Raven Press, New York (1973), p. 545-557

Bekersky, I.; Maggio, A.C.; Mattiliano, V.; Boxenbaum, H.G.; Maynard, D.E.; Cohn, P.D.; Kaplan, S.A.: Influence of phenobarbital on the disposition of clonazepam and antipyrine in the dog.
J.Pharmacokin.Biopharm. 5, 507-512 (1977)

Beglinger, R.; Hamza, B.; Heizmann, P.; Kyburz, E., Rehm, W.F.: Untersuchungen zur Anwendung und Antagonisierung von Benzodiazepinen beim Rind.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 89, 137-142 (1982)

Bergamini, L.; Utani, R.; Fariello, R.; Liboni, W.: Elektroenzephalographische und klinische Bewertung des neuen Benzodiazepins Ro 5/4023.
EEG/EMG 1, 182-188 (1970)

Blum, J.E.; Haefely, W.; Jalfre, M.; Polc, P.; Schärer, K.: Pharmakologie und Toxikologie des Antiepileptikums Clonazepam.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 377-389 (1973)

Bonetti, E.P., Pieri, L.; Cumin, R., Schaffner, R.; Pieri, M.; Gamzu, E.R.; Müller, R.K.M.; Haefely, W.: Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: Neurological and behavioral effects.
Psychopharmacology 78, 8-18 (1982)

Braestrup, C.; Squires, R.F.: Spezific benzodiazepine receptors in rat brain characterised by high-affinity ^{3}H-diazepam binding.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3805-3806 (1977)

Browne, T.R.; Penry, J.K.: Benzodiazepines in the treatment of epilepsy. A review.
Epilepsia 14, 277-310 (1973)

Browne, T.R.: Clonazepam. A review of a new antoconvulsant drug.
Arch. Neurol. 33, 326-332 (1976)

Carranza, J.: Long term use and abuse of benzodiazepines.
Pharmakopsychiatr. Neuropsychopharmakol. 13, 254-258, (1980)

Chang, L.-R.; Bernard, E.A.: The benzodiazepine/GABA receptor complex: molecular size in brain synaptic membrane and in solution.
J. Neurochem. 39, 1507-1518 (1982)

Chiu, T.H.; Rosenberg, H.C.: Reduced diazepam binding following chronic benzodiazepine treatment.
Life Sci. 23, 1153-1158 (1978)

Crawley, J.N.; Marangos, P.J.; Stivers, J.; Goodwin, F.K.: Chronic clonazepam administration induces benzodiazepine receptor subsensivity.
Neuropharmacology 21, 85-89 (1982)

Costa, E.; Guidotti, A.; Mao, C.C.: Evidence for the involvment of GABA in the action of benzodiazepines: studies on rat cerebellum.
In: Costa, E.; Greengard, P. (Eds.): Mechanisms of Action of benzodiazepines, Raven Press, New York, p. 113-130 (1975)

Darragh, A.; Lambe, R.; Brick, I.; O'Boyle, C.: Antagonism of the central effects of 3-methyl-clonazepam.
Br. J. clin. Pharmacol. 14, 871-872 (1982)

Doenicke, A.; Suttmann, H.; Kapp, W.; Kugler, J.; Ebentheuer, H.: Zur Wirkung des Benzodiazepin-Antagonisten Ro 15-1788.
Anaesthesist 33, 343-347 (1984)

Dumermuth, G.; Kovacs, E.: Die Wirkung von Clonazepam in der peroralen Langzeittherapie schwerer Epilepsieformen des Kindesalters.
Schweiz. med. Wschr. 104, 608-617 (1974)

Eadie, M.J.: Clinical use of antiepileptic drugs.
In: Frey, H.-H.; Janz, D. (Eds.): Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 74, Springer Verlag, Berlin, p. 765-790 (1984)

Eschenhof, E.: Untersuchungen über das Schicksal des Antikonvulsivums Clonazepam im Organismus der Ratte, des Hundes und des Menschen.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, 390-400 (1973)

Esplin, D.W.; Woodbury, D.M.: The fate and excretion of C^{14}-labelled pentylentetrazole in the rat, with comments on analytical methods for pentylentetrazol.
J. Pharmacol. exp. Ther. 118, 129-138 (1956)

File, S.E.; Lister, R.G.; Nutt, D.J.: The anxiogenic actions of benzodiazepine antagonists.
Neuropharmacology 21, 1033-1037 (1982)

Frey, H.-H.: Dosierung von Succinylcholin beim Hund.
Anaesthesist 21, 230-231 (1972)

Frey, H.-H.; Löscher, W.: Anticonvulsant potency of unmetabolized diazepam.
Pharmacology 25, 154-159 (1982)

Frey, H.-H.; Philippin, H.-P.; Scheuler, W.: Development of tolerance to the anticonvulsant effect of diazepam in dogs.
European J. Pharmacol. 104, 27-38 (1984)

Greenblatt, D.J.; Shader, R.I.: Dependence, tolerance and addiction to benzodiazepines: Clinical and pharmacokinetic considerations.
Drug Metab. Rev. 8, 13-28 (1978)

Gallagher, D.W.; Lakoski, J.M.; Gonsalves, S.F.; Rauch, S.L.: Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity.
Nature (Lond.) 308, 74-77 (1984)

Haefely, W.; Kulcsar, A.; Möhler, H.; Polc, P.; Schaffner, R.: Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines.
In: Costa, E.; Greengard, P. (Eds.): Mechanism of Action of Benzodiazepines, Raven Press, New York, p. 131-151 (1975)

Haefely, W.E.: Central actions of benzodiazepines: General introduction.
Br. J. Psychiatry 133, 231-238 (1978)

Haefely, W.; Pieri, L.; Polc, P.; Schaffner, R.: General pharmacology and neuropharmacology of benzodiazepine derivatives.
In: Hoffmeister, F.; Stille, G. (Eds.): Handbook of experimental pharmacology, Vol. 55 II, Springer Verlag, Berlin, p. 13-262 (1981)

Harrison, M.; Busto, U.; Naranjo, C.A.; Kaplan, H.L.; Sellers, E.M.: Diazepam tapering in detoxification for high-dose benzodiazepine abuse.
Clin. Pharmacol. Ther. 36, 527-533 (1984)

Himmelsbach, C.K.: Studies of certain addiction characteristics of (a) dihydromorphine ("Paramorphan"), (b) dihydrodesoxymorphine-D ("Desomorphine"), (c) dihydrodesoxycodeine-D ("Desocodeine"), and (d) methyldihydromorphinone ("Metopon").
J. Pharmacol. exp. Ther. 67, 239-249 (1939)

Hollister, L.E.; Motzenbecker, F.P.; Degan, R.O.: Withdrawal reactions from chlordiazepoxide ("Librium").
Psychopharmacologia 2, 63-68 (1961)

Hunkeler, W.; Möhler, H.; Pieri, L.; Polc, P.; Bonetti, E.P.; Schaffner, R.; Haefely, W.: Selective antagonists of benzodiazepines.
Nature (Lond.) 290, 514-516 (1981)

Jaffe, J.H.; Sharpless, S.K.: The rapid development of physical dependence on barbiturates.
J. Pharmaco. exp. Ther. 150, 140-145 (1965)

Jensen, L.H.; Petersen, E.N.; Braestrup, C.: Audiogenic seizures in DBA/2 mice discriminates sensitively between low efficiacy benzodiazepine receptor agonists and inverse agonists.
Life Sci. 33, 393-399 (1983)

Jun, H.W.: Pharmacokinetic studies of pentylentetrazole in dogs.
J. pharm. Sci. 65, 1038-1041 (1976)

Kaijima, M.; Le Galle La Salle, G.; Rossier, J.: The partial benzodiazepine agonist properties of Ro 15-1788 in pentylentetrazole-induced seizures in cats.
European J. Pharmacol. 93, 113-115 (1983)

Kemper, N.; Poser, W.; Poser, S.: Benzodiazepin-Abhängigkeit. Suchtpotential der Benzodiazepine größer als bisher angenommen.
Dtsch. med. Wschr. 105, 1707-1712 (1980)

Kick, H.; Dreyer, R.: Klinische Erfahrungen mit Clonazepam unter besonderer Berücksichtigung psychomotorischer Anfälle.
Acta neurol. scand. 49, Suppl. 53, 54-59 (1973)

Kilian, M.; Frey, H.-H.: Threshold for electro- and chemoconvulsions in mice after termination of treatment with phenobarbital.
Pharmacology 10, 169-177 (1973)

Killam, E.K.; Matsuzaki, M.; Killam, K.F.: Effects of chronic administration of benzodiazepines on epileptic seizures and brain electrical activity in Papio papio.
In: Garattini, S.; Mussini, E.; Randall, L.O. (Eds.): The Benzodiazepines, Raven Press, New York, p. 443-460 (1973)

Knop, H.J.; van der Klein, E.; Edmunds, L.C.: Pharmacokinetics of clonazepam in man and laboratory animals.
In: Schneider, H.; Janz, D.; Gardner-Thorpe, C.; Meinardi, H.; Sherwin, A.L. (Eds.): Clinical Pharmacology of Antiepileptic Drugs, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 247-259 (1975)

Kolb, L.; Himmelsbach, C.K.: Clinical studies of drug addiction. III: A critical review of the withdrawal treatments with method of evaluating abstinence syndroms.
Am. J. Psychiatr. 94, 759-799 (1938)

Kruse, R.; Blankenhorn, V.: Zusammenfassender Erfahrungsbericht über die klinische Anwendung und Wirksamkeit von Ro 5-4023 (Clonazepam) auf verschiedene Formen epileptischer Anfälle.
Acta neurol. scand. 49, Suppl. 53, 60-71 (1973)

Lister, R.G.; File, S.E.; Greenblatt, D.J.: Functional tolerance to lorazepam in the rat.
Psychopharmacology 81, 292-294 (1983)

Löscher, W.; Frey, H.-H.: Pharmacokinetics of diazepam in the dog.
Arch. int. Pharmacodyn. 254, 180-195 (1981)

Löscher, W.: Alterations in CSF GABA levels and seizure susceptibility developing during repeated administration of pentetrazole in dogs. Effects of γ-acetylenic GABA, valproic acid and phenobarbital.
Neurochem. Int. 5, 405-412 (1983)

Löscher, W.; Al-Tahan, F.J.O.: Rapid gas chromatography assay of underivatized clonazepam in plasma.
Ther. Drug Monit. 5, 229-233 (1983)

Löscher, W.; Frey, H.-H.: Kinetics of penetration of common antiepileptic drugs into cerebrospinal fluid.
Epilepsia 25, 346-352 (1984)

Lukas, S.E.; Griffiths, R.R.: Precipitated withdrawal in baboons: Effects of dose and duration of diazepam exposure.
European J. Pharmacol. 100, 163-171 (1984)

MacDonald, R.L.; Barker, J.L.: Pentylentetrazole and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons.
Nature (Lond.) 267, 720-721 (1977)

McNicholas, L.F.; Martin, W.R.: The effect of a benzodiazepine antagonist, Ro 15-1788, in diazepam dependent rats.
Life Sci. 31, 731-737 (1982)

McNicholas, L.F.; Martin, W.R.; Cherian, S.: Physical dependence on diazepam and lorazepam in the dog.
J. Pharmacol. exp. Ther. 226, 783-789 (1983)

Marangos, P.J.; Paul, S.M.; Parma, A.M.; Goodwin, F.K.; Syapin, P.; Skolnick, P.: Purinergic inhibition of diazepam binding to rat brain in vitro.
Life Sci. 24, 851-858 (1979)

Marks, J.: The benzodiazepines - use, overuse, misuse, abuse.
Printed in Great Britain by Mather Bros. (Printers) (1977)

Marks, J.: The benzodiazepines - use and abuse.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 30, 898-901 (1980)

Martin, I.L.: The benzodiazepines: Functional complexity.
Trends Pharmac. Sci. 5, 343-347 (1984)

Martin, W.R.; McNicholas, L.F.; Cherian, S.: Diazepam and phenobarbital dependence in the rat.
Life Sci. 31, 721-730 (1982)

Martin, I.L.; Brown, C.L.; Doble, A.: Multiple benzodiazepine receptors: Structures in the brain or structures in the mind? A critical review.
Life Sci. 32, 1925-1933 (1983)

Masland, R.L.: A controlled trial of clonazepam in temporal lobe epilepsy.
Acta neurol. scand. 51, Suppl. 60, 49-54 (1975)

Mitenko, P.; Ogilvie, R.: Rapidly achieved plasma concentration plateaus, with observation on theophyllin kinetics.
Clin. Pharmacol. Ther. 13, 329-335 (1972)

Möhler, H.; Okada, T.: Benzodiazepine receptors: demonstration in the CNS.
Science 198, 849-851 (1977)

Möhler, H.; Okada, T.; Enna, S.J.: Benzodiazepine and neurotransmitter receptor binding in rat brain after chronic administration of diazepam or phenobarbital.
Brain Res. 156, 391-395 (1978)

Möhler, H.; Richards, J.G.: Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interactions in vitro.
Nature (Lond.) 294, 763-764 (1981)

Möhler, H.; Richards, J.G.: Receptors for anxiolytic drugs.
In: Malick, J.B.; Enna, S.J., Yamamura, H.I. (Eds.): Neurochemical, Behavioural and Clinical Perspectives, Raven Press, New York, p. 15-40 (1983)

Müller, W.E.; Schläfer, U.; Wollert, U.: Benzodiazepine receptor binding: The interaction of some nonbenzodiazepine drugs with spezific ^{3}H-diazepam binding to rat brain synaptosomal membranes.
Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 305, 23-26 (1978)

Olsen, R.W.: Drug interactions at the GABA receptor-ionophore complex.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22, 245-277 (1982)

Parsonage, M.J.; Norris, J.: Use of diazepam in treatment of severe convulsive status epilepticus.
Brit. med. J. III, 85-88 (1967)

Pellmar, T.C.; Wilson, W.A.: Synaptic mechanism of pentylentetrazole sensitivity for chloride conductance.
Science 197, 912-914 (1977)

Peters, V.H.; Seidel, M.: Medikamentenmißbrauch und Sucht bei Diazepam.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 876-877 (1970)

Philippin, H.-P.: Versuche zum Nachweis einer Toleranz und akuten Toleranz gegen die antikonvulsive Wirkung von Diazepam beim Hund.
Diss. Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Journal Nr. 1165 (1984)

Polc, P.; Bonetti, E.P.; Schaffner, R.; Haefely, W.: A three-state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquilisers, ß-carbolines and phenobarbital.
Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 321, 260-264 (1983)

Ramanjanevulu, R.; Ticku, M.K.: Interactions of pentamethylentetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex.
European J. Pharmacol. 98, 337-345 (1984)

Rehavi, M.; Skolnick, P.; Paul, S.M.: Effects of tetrazole derivatives on ^{3}H-Diazepam binding in vitro: Correlation with convulsant potency.
European J. Pharmacol. 78, 353-356 (1982)

Richards, J.G.; Möhler, H.: Benzodiazepine receptors.
Neuropharmacology 23, 233-242 (1984)

Richards, J.G.; Möhler, H.; Haefely, W.: Benzodiazepine binding sites: receptors or acceptors?
Trends Pharmacol. Sci. 3, 233-235 (1982)

Rosenberg, H.C.; Chiu, T.H.: Tolerance during chronic benzodiazepine treatment associated with decreased receptor binding.
European J. Pharmacol. 70, 453-460 (1981)

Rosenberg, H.C.; Chiu, T.H.: Nature of functional tolerance produced by chronic flurazepam treatment in the cat.
European J. Pharmacol. 81, 357-365 (1982a)

Rosenberg, H.C.; Chiu, T.H.: An antagonist-induced benzodiazepine abstinence syndrom.
European J. Pharmacol. 81, 153-157 (1982b)

Rossi, G.F.; di Rocco, C.; Maira, G.; Meglio, M.: Experimental and clinical studies of the anticonvulsant properties of a benzodiazepine derivative, clonazepam (Ro 5-4023).
In: Garattini, S.; Mussini, E.; Randall, L.O. (Eds.): The Benzodiazepines, Raven Press, New York, p. 461-488 (1973)

Ryan, G.P.; Boisse, N.R.: Experimental induction of benzodiazepine tolerance and physical dependence.
J. Pharmacol. exp. Ther. 226, 100-107 (1983)

Scholfield, C.N.: Convulsants antagonize inhibition in the olfactory cortex slice.
Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 314, 29-36 (1980)

Scollo-Lavizzari, G.: First clinical investigation of the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 in comatose patients.
Eur. Neurol. 22, 7-11 (1983)

Sher, P.K.: Reduced benzodiazepine receptor binding in cerebral cultures chronically exposed to diazepam.
Epilepsia 24, 313-320 (1983)

Sieghart, W.; Karobath, M.: Molecular heterogenity of benzodiazepine receptors.
Nature (Lond.) 286, 285-287 (1980)

Sigel, E.; Stephenson, F.A.; Mamalaki, C.; Barnard, E.A.: A γ-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex - purification and partial characterisation.
J. Biol. Chem. 258, 6965-6971 (1983)

Simmonds, M.A.: Presynaptic actions of γ-aminobutyric acid and some antagonists in a slice preparation of cuneate nucleus.
Br. J. Pharmacol. 63, 495-502 (1978)

Simmonds, M.A.: Classification of some GABA antagonists with regard to site of action and potency in slices of rat cuneate nucleus.
European J. Pharmacol. 80, 347-358 (1982)

Smith, C.M.: The pharmacology of sedative/hypnotics, alcohol, and anesthetics: Sites and mechanism of action.
In: Martin, W.R. (Ed.): Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 45 I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 496-578 (1977)

Stone, W.E.: Systemic chemical convulsants and metabolic derangement.
In: Bury, D.M.; Walter, R.D. (Eds.): Experimental Models of Epilepsy, Raven Press, New York, 407-432, 1972

Sternbach, L.H.; Fryer, R.I.; Keller, O.; Metlessics, W.; Sach, G.; Steiger, N.: Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. Nitro-substituted 5-phenyl-1,4-benzodiazepine derivatives.
J. Med. Chem. 6, 261-265 (1963)

Study, R.E.; Barker, J.L.: Cellular mechanisms of benzodiazepine action.
J. Am. med. Ass. 247, 2147-2151 (1982)

Swinyard, E.A.; Castellion, A.W.: Anticonvulsant properties of some benzodiazepines.
J. Pharmacol. exp. Ther. 151, 363-375 (1966)

Tallman, J.F.; Paul, S.M.; Skolnick, P.; Gallagher, D.W.: Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines.
Science 207, 274-281 (1980)

Vellucci, S.V.; Webster, R.A.: Is Ro 15-1788 a partial agonist at benzodiazepine receptors?
European J. Pharmacol. 90, 263-268 (1983)

Vellucci, S.V.; Webster, R.A.: Antagonism of caffeine-induced seizures in mice by Ro 15-1788.
European J. Pharmacol. 97, 289-293 (1984)

Vohland, H.W.; Koransky, W.: Effect of α-hexachlorocyclohexane on metabolism and excretion of pentetrazole (Cardiazol) in the rat.
Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 273, 99-108 (1972)

Woodbury, D.: Convulsant drugs: Mechanisms of action.
In: Glaser, G.H.; Penny, J.K.; Woodbury D.M. (Eds.): Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action, Raven Press, New York, p. 249-303 (1980)

Yanagita, T.; Takahashi, S.: Dependence liability of several sedative-hypnotic agents evaluated in monkeys.
J. Pharmacol. exp. Ther. 185, 307-316 (1973)

Yanaura, S.; Tagashira, E.; Suzuki, T.: Physical dependence on morphine, phenobarbital and diazepam in rats by drug-admixed food ingestion.
Jpn. J. Pharmacol. 25, 453-463 (1975)

Yonekawa, W.D.; Kupferberg, H.J.; Woodbury, D.M.: Relationship between pentylentetrazole-induced seizures and brain pentylentetrazole levels in mice.
J. Pharmacol. exp. Ther. 214, 589-593 (1980)

Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche und praktische Anleitung bei der Durchführung der Versuche sowie bei der Abfassung dieser Dissertation bin ich Herrn Prof. Dr. H.-H. Frey zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. W. Scheuler (Klinikum Charlottenburg) danke ich für seine Hilfe bei der Auswertung und Beschreibung der Elektroenzephalogramme.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Wilk bedanke ich mich für die Möglichkeit, einen Teil der Versuche in den Zentralen Tierversuchslaboratorien Berlin durchführen zu können.

Für die gewährte technische Hilfe bei der Durchführung der Versuche bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Renate Jäckel, Frau Petra Layer und Herrn Eberhard Manz sowie bei allen weiteren Mitarbeitern des hiesigen Labors für ihre allzeitige Hilfsbereitschaft und ihr stets freundliches Entgegenkommen.

Zum Schluß möchte ich meiner Verlobten danken, ohne deren Verständnis und Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie allen Freunden, die indirekt dazu beigetragen haben.

LEBENSLAUF

Am 7. Juni 1955 wurde ich in Rottenburg, Kreis Landshut, als Sohn des Industriekaufmanns Rudolf Scherkl und seiner Frau Irmgard, geb. Walter, geboren.

1961 - 1965	Besuch der Volksschule Rottenburg
1965 - 1974	Besuch des math.-naturw. Hans Leinberger-Gymnasiums in Landshut
1974 - 1976	Wehrdienst in Freising, Obb.
1977 - 1983	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
15.04.1983	Approbation als Tierarzt
01.07.1983	Beginn als Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin